

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Рубцова Мария Петровна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОГЕНЕЗА И
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ТЕЛОМЕРАЗНОЙ РНК ЧЕЛОВЕКА

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология,
02.00.10 – биоорганическая химия.

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:
д.х.н, профессор, академик РАН **Донцова Ольга Анатольевна**

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1. Теломеры и теломераза	14
1.1.1. Теломеры. Структура и функции	14
1.1.2. Структура теломеразы	20
1.1.3. Взаимодействие теломеразы с теломерами	26
1.1.4. Удлинение теломер	28
1.2. Биогенез теломеразной РНК	30
1.3. Альтернативные функции теломеразной РНК	38
1.3.1. Теломеразная РНК в онкогенезе	39
1.3.2. Теломеразная РНК как регулятор экспрессии генов	41
1.3.3. Теломеразная РНК и защитные механизмы клетки	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Используемые реактивы и буферные растворы	46
2.2. Методы молекулярного клонирования	54
2.2.1. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	54
2.2.2. Трансформация компетентных клеток <i>E. Coli</i>	55
2.2.3. Выделение плазмидной ДНК	55
2.2.4. Выделение плазмидной ДНК для трансфекции эукариотических клеток	56
2.2.5. Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле	56
2.2.6. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля	57
2.2.7. Создание генетических конструкций для получения модельных клеточных линий	57
2.2.8. Создание конструкций, содержащих мутации в гене теломеразной РНК человека	58
2.2.9. Создание конструкций для выключения экспрессии гена теломеразной РНК человека	59

2.2.10. Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов	59
2.3. Методы работы с культурами клеток эукариот	59
2.3.1. Культивирование клеток	59
2.3.2. Выделение геномной ДНК	60
2.3.3. Трансфекция клеток кальций-фосфатным методом	60
2.3.4. Инфекция клеток вирусными частицами	61
2.3.5. Сортировка клеток	62
2.3.6. Трансфекция клеток малыми интерферирующими РНК	62
2.3.7. Трансфекция клеток при помощи электропорации	63
2.3.8. Иммунофлуоресцентная микроскопия	63
2.3.9. Анализ выживаемости клеток	64
2.3.10. Ингибирование аутофагии	65
2.4. Методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками	65
2.4.1. Выделение суммарной РНК, обработка ДНКазой и получение кДНК	65
2.4.2. ПЦР в реальном времени	65
2.4.3. Нозерн-блоттинг	66
2.4.4. Определение 3'-границы транскрипта 3'-RACE	67
2.4.5. Определение 5'-границы транскрипта 5'-RACE	68
2.4.6. Приготовление клеточных экстрактов S100	69
2.4.7. Иммунопреципитация RPA	70
2.4.8. Разделение клеточного экстракта на ядерную и цитоплазматическую фракции	70
2.4.9. Белковый электрофорез в ПААГ-ДСН	71
2.4.10. Вестерн-блоттинг	71
2.4.11. Определение активности теломеразы. TRAP-тест	72
2.4.12. Анализ длины теломер	74
2.5. Анализ сборки теломеразы	74
2.5.1. Разделение экстрактов ультрацентрифугированием в градиенте концентраций сахарозы	74

2.5.2. Выделение РНК	75
2.5.3. T7-транскрипция hTERC	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	76
3.1. Взаимодействие теломеразы с теломерами	76
3.1.1. Репликативный белок А модулирует взаимодействие теломеразы с теломерами	76
3.2. Биогенез теломеразы – потенциальный объект для разработки терапевтических подходов	84
3.2.1. Ингибирование сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК	85
3.2.2. Транскрипция и процессинг теломеразной РНК человека	94
3.2.3. Теломеразная РНК человека -- матрица для синтеза белка, обладающего защитными свойствами	111
3.3. Заключение	128
ВЫВОДЫ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. -- аминокислотный остаток

Да, кДа -- дальтон, килодальтон

ДМСО -- диметилсульфоксид

ДНК -- дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

ДТТ -- дитиотреитол

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная РНК

мяРНК -- малая ядерная РНК

мяоРНК -- малая ядрышковая РНК

scaРНК – малая ядрышковая РНК, локализуемая в тельцах Кахаля

РНП -- рибонуклеопротеин

н.о. -- нуклеотидные основания

п.н. – пара нуклеотидов

ОВ-мотив – олигонуклеотид/олигосахарид связывающий мотив

ОРС -- открытая рамка считывания

ОТ – обратная транскрипция

оцДНК – одноцепочечная ДНК

ПААГ -- полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНКаза – рибонуклеаза

ЭДТА -- этилендиаминтетраацетат натрия

CR–консервативный участок в составе теломеразной РНК

CRISPR -- clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

dNTP -- дезоксинуклеотидтрифосфат

TERT– теломеразная обратная транскриптаза

TER, TR, TERC -- теломеразная РНК

TLC1 – теломеразная РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

TERRA – РНК, содержащая теломерные повторы

TRAP – протокол амплификации теломерных повторов

FBS -- фетальная бычья сыворотка

HEK -- клетки почки эмбриона человека

HEPES -- N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоная кислота

INTS -- Integrator subunit, субъединица комплекса Integrator

Ni-NTA -- нитрилацетат никеля

OD -- оптическая плотность

PBS -- фосфатный буферный раствор

PK – pseudoknot – псевдоузел

RPA – репликативный белок A

RACE -- быстрая амплификация концов комплементарной ДНК

TdT -- терминальная трансфераза

Tris -- трис(гидроксиметил)аминометан

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания, согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), занимают в мире второе место по количеству смертей в год. В основе развития онкологических заболеваний лежат мутации в генах, регулирующих механизмы деления клеток, что приводит к приобретению ими неограниченного потенциала деления. Нормальные соматические клетки организма не способны делиться бесконечно. Обычно после прохождения клеткой предела Хайфлика (примерно 50 делений) концевые участки хромосом – теломеры – становятся критически короткими, что приводит к нестабильности генома и активации клеточных программ гибели. Активация теломеразы, происходящая в 85-90% случаев онкологической трансформации клеток, способствует поддержанию длины теломер, необходимой для неограниченного деления. В то же время теломераза привлекает внимание научной общественности, как потенциальный инструмент увеличения продолжительности жизни организма. Активация теломеразы способствует регенерации тканей, а мутации в генах компонентов этого фермента ассоциированы с заболеваниями, характеризующимися фенотипом преждевременного старения. Считается, что увеличение длины теломер позволит клеткам проходить большее количество делений, что обеспечит более длительное и здоровое функционирование организма.

Исследования, направленные на понимание механизмов функционирования и биогенеза теломеразы, проводятся с момента открытия этого фермента и рассматриваются в контексте разработки подходов к терапии онкологических заболеваний, а также процессов регенерации тканей и увеличения продолжительности жизни. Тем не менее, начиная с самых ранних работ по исследованию роли теломеразы в онкологической трансформации клеток, ученые наблюдали эффекты, оказываемые отдельными компонентами комплекса на пролиферативный статус клетки, на устойчивость к стрессу и

другие процессы вне зависимости от активации теломеразы и длины теломер. Исследования последних лет продемонстрировали, что компоненты теломеразы в различных условиях могут иметь локализацию отличную от ядерной, где этот комплекс осуществляет свою основную роль, а также обладают дополнительными функциями, которые необходимо учитывать при разработке различных подходов, направленных как на терапию онкологических заболеваний, так и стимуляцию регенерации тканей или увеличение продолжительности жизни.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследование механизмов регуляции разных этапов функционирования теломеразы, затрагивающих формирование активного комплекса и взаимодействие с теломерами, а также биогенез и альтернативные функции теломеразной РНК человека.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- 1). Изучить влияние репликативного белка А на активность теломеразы *in vitro*. Предложить модель регуляции взаимодействия теломеразы с теломерой.
- 2). Изучить возможность ингибирования сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК.
- 3). Выяснить роль Интегратора в регуляции транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека.
- 4). Проверить гипотезу о кодирующем потенциале теломеразной РНК человека.

Объект исследования – регуляция активности теломеразы человека.

Предмет исследования – биогенез и функционирование компонентов теломеразы человека.

Научная новизна и практическая значимость работы

Получены новые данные о биогенезе и функционировании компонентов теломеразы человека.

Взаимодействие теломеразы со своим субстратом – теломерой – является важным лимитирующим активность фермента событием, в регуляции которого участвуют многие клеточные компоненты. Мы продемонстрировали, что репликативный белок А (RPA – replicative protein A), влияя на доступность теломеры, регулирует активность теломеразы человека *in vitro*.

Установлено, что конформационная подвижность теломеразной РНК человека необходима для функционирования фермента, а фиксация структуры в одной из конформаций препятствует сборке активного фермента.

Использование репортерной системы для изучения терминации транскрипции теломеразной РНК человека позволило доказать ключевую роль мультисубъединичного комплекса Интегратор в промотор-зависимом процессинге первичного транскрипта.

Нарушения в процессе терминации транскрипции приводят к накоплению длинного первичного транскрипта, содержащего открытую рамку считывания для синтеза белка, существование которого продемонстрировано в настоящей работе при помощи нескольких взаимодополняющих методов. Белок hTERP, закодированный в теломеразной РНК человека, защищает клетку в стрессовых условиях и участвует в регуляции формирования аутофагосомы.

Полученные в настоящей работе данные о функционировании и биогенезе компонентов теломеразы человека будут востребованы в области разработки подходов к терапии онкологических заболеваний, а также в области регенерации тканей и увеличения продолжительности жизни.

Методология диссертационного исследования

При проведении исследования использовали современные методы биохимии, молекулярной и клеточной биологии. Плазмиды нарабатывали в штаммах-продуцентах *E.coli*. Препараты плазмид и РНК получали с использованием специализированных наборов реагентов от ведущих фирм-производителей. Чистоту препаратов нуклеиновых кислот проверяли методами электрофореза и спектрофотометрии. Экстракты клеток получали согласно современным методикам с использованием реактивов ведущих фирм производителей. Создание клеточных линий осуществляли, используя новейшие подходы и методики, в том числе направленного редактирования генома. Отбор клеточных популяций проводили при помощи современного высокоскоростного клеточного сортера BD FACSAria III. Подбор праймеров для полимеразной цепной реакции осуществляли при помощи онлайн-системы Primer-Blast (NCBI). ПЦР в реальном времени проводили при помощи прибора Bio-Rad CFX96 Real-Time System, а для обработки данных использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager. Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.2.0. В работе использовали документирующую систему ChemiDoc XRS System BioRad и микроскопы Nikon C2 и Nikon Ti-Eclipse. Идентификацию спектров проводили, используя программное обеспечение PeakView 2.1 Software (ABSciex, Canada).

Основные положения, выносимые на защиту

Репликативный белок А модулирует активность теломеразы *in vitro*. RPA способствует взаимодействию теломеразы с теломерой, стимулируя удлинение теломер. Кооперативный характер связывания RPA с одноцепочечной ДНК блокирует взаимодействие теломеразы с теломерой, ингибируя синтез теломерных повторов.

Конформационные перестройки критичны для активности и сборки теломеразы. Фиксация расположения доменов теломеразной РНК человека блокирует сборку активного фермента.

Терминация транскрипции гена теломеразной РНК человека зависит от промотора. Промотор определяет корректность процессинга первичного транскрипта теломеразной РНК человека.

Мультисубъединичный комплекс Интегратор является ключевым регулятором транскрипции и биогенеза теломеразной РНК человека. Нокдаун генов субъединиц Интегратора приводит к накоплению в клетках предшественника теломеразной РНК человека.

Теломеразная РНК человека обладает кодирующим потенциалом. Белок hTERP, матрицей для синтеза которого служит теломеразная РНК человека, защищает клетки от гибели в условиях индукции апоптоза.

Степень достоверности результатов

В работе использовали современные широко применяемые методики измерений и оборудование, соответствующее международным стандартам, реактивы ведущих российских и международных производителей. Последовательности генов и фрагментов ДНК проверяли при помощи секвенирования. Культуры клеток происходили из международных коллекций и были дополнительно проверены на контаминацию микоплазмой. Эксперименты проводили как минимум трижды в трех технических повторностях. Статистическую обработку данных Вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.2.0. Статистическую обработку данных масс-спектрометрии осуществляли, применяя алгоритм ProteomicS Performance Evaluation Pipeline Software (PSPEP) программного обеспечения ProteinPilot.

Все результаты, представленные в диссертационной работе, опубликованы в международных рецензируемых журналах.

Апробация работы

Диссертация была апробирована на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 12 сентября 2019 года. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на всероссийских и международных конференциях (15 тезисов), в том числе на международных конференциях “Telomeres & Telomerase” Колд Спринг Харбор, США, 2011, 2013, 2017; The FEBS Congress, Санкт-Петербург 2013, Иерусалим 2017, Прага 2018; Keystone Symposium “Long Noncoding RNAs: Marching toward Mechanism” Санта-Фе, США, 2014, “Long Noncoding RNAs: From Evolution to Function”. Keystone Resort, 2015; ПОСТГЕНОМ, Казань, 2014, 2018; V съезд биохимиков России, Дагомыс, 2014; EMBO Workshop “Telomere biology in health and human disease”, Португалия, 2018.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 16 публикациях, в том числе: 15 -- в международных системах цитирования Web of Science и Scopus, а также в библиографической базе PubMed и 1 статья в журнале, входящем в РИНЦ.

Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором лично. Исследования затрагивали многие аспекты молекулярной биологии и выполнены в соавторстве с большим коллективом. Однако, автору принадлежит основная роль в выборе направления исследований, формулировке целей и задач исследований, проведении экспериментов, разработке методик, анализу полученных результатов, обобщении и представлении результатов в виде статей и докладов на конференциях. Некоторые исследования были проведены сотрудниками кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: Зверевой М.Э.,

Скворцовым Д.А, Остерманом И.А., а также аспирантами и дипломниками кафедры под руководством автора: Васильковой Д.П., Нарайкиной Ю.В., Юртаевой С.В. Автор принимала непосредственное участие в работах сотрудников Института Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН Терехова С.С., Смирнова И.В. и Степанова А.В. Работы выполнены при поддержке грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) и Российского Научного Фонда (РНФ), а также Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова (ПНР 5.13).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы» (раздел содержит 181 ссылку). Работу иллюстрируют 48 рисунков и 5 таблиц. Общий объем диссертации 147 страниц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Теломеры и теломераза

1.1.1. Теломеры. Структура и функции.

Геном клеток эукариот организован в линейные молекулы ДНК [1], концы которых представляют собой протяженные участки, состоящие из коротких повторов [2]. Концевые участки хромосом, названные теломерами, предотвращают потерю генетической информации в результате проблемы недорепликации концов, защищают концы хромосом от распознавания системами репарации ДНК, а также участвуют в формировании архитектуры ядра [3]. В ходе репликации ДНК-полимераза использует в качестве затравки РНК-праймер, который впоследствии удаляется, а брешь внутри цепи заполняется. После удаления РНК-затравки на конце линейной хромосомы остается незаполненная брешь, в результате чего образуется 3'-выступающий конец (рис.1) [4,5]. Последовательность теломерных повторов отличается у разных организмов. У млекопитающих теломерный повтор имеет последовательность 5'-TTAGGG-3', а теломера представляет собой двуцепочечный участок длиной несколько тысяч пар нуклеотидов (п.н.), переходящим в одноцепочечный 3'-выступающий конец G-богатой цепи, состоящий из нескольких сотен нуклеотидных остатков (н.о.). Теломерная ДНК в комплексе с теломерными белками формирует так называемый теломерный хроматин, который защищает концы линейных хромосом от узнавания системами репарации клетки, участвует в формировании архитектуры ядра и расположении хромосом за счет их прикрепления к ядерному матриксу, а также определяет пролиферативный потенциал клетки, контролируя длину теломерных участков [6].

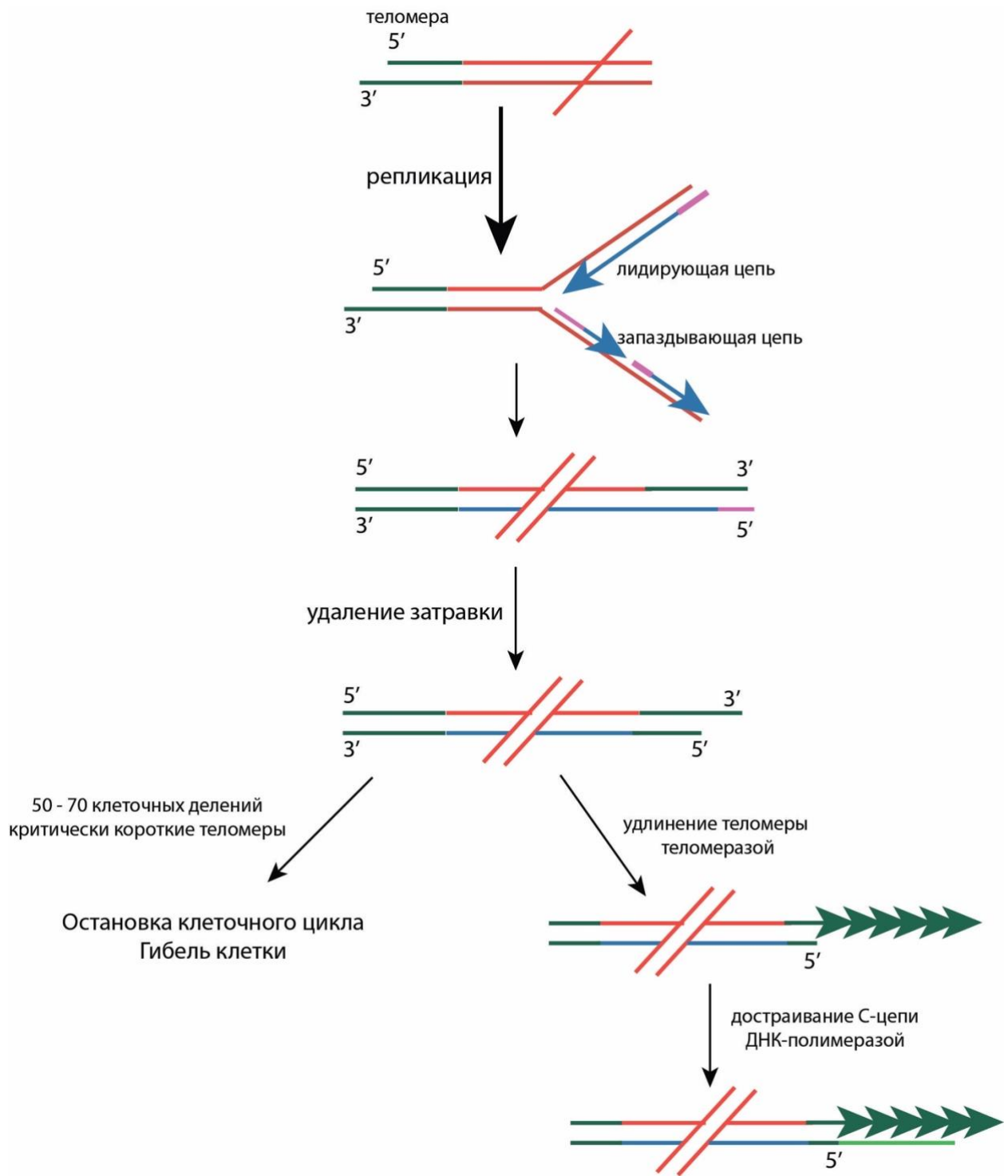


Рисунок 1. Проблема недорепликации концов линейных хромосом.

Схема, иллюстрирующая репликативное укорочение теломер и роль теломеразы в удлинении теломер.

Белки теломерного хроматина также участвуют в привлечении теломеразы к концам хромосом и их удлинении. Комплекс белков, организующих теломерный хроматин, называется шелтерин [7,8] и состоит из 6 различных компонентов: TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 и POT1 (рис.2А). TRF1 и TRF2 образуют гомодимеры и взаимодействуют с двуцепочечными участками теломер, TIN2 стабилизирует это взаимодействие. POT1 стабилизирует это взаимодействие. TPP1 стабилизирует это взаимодействие. 3' выступающая цепь

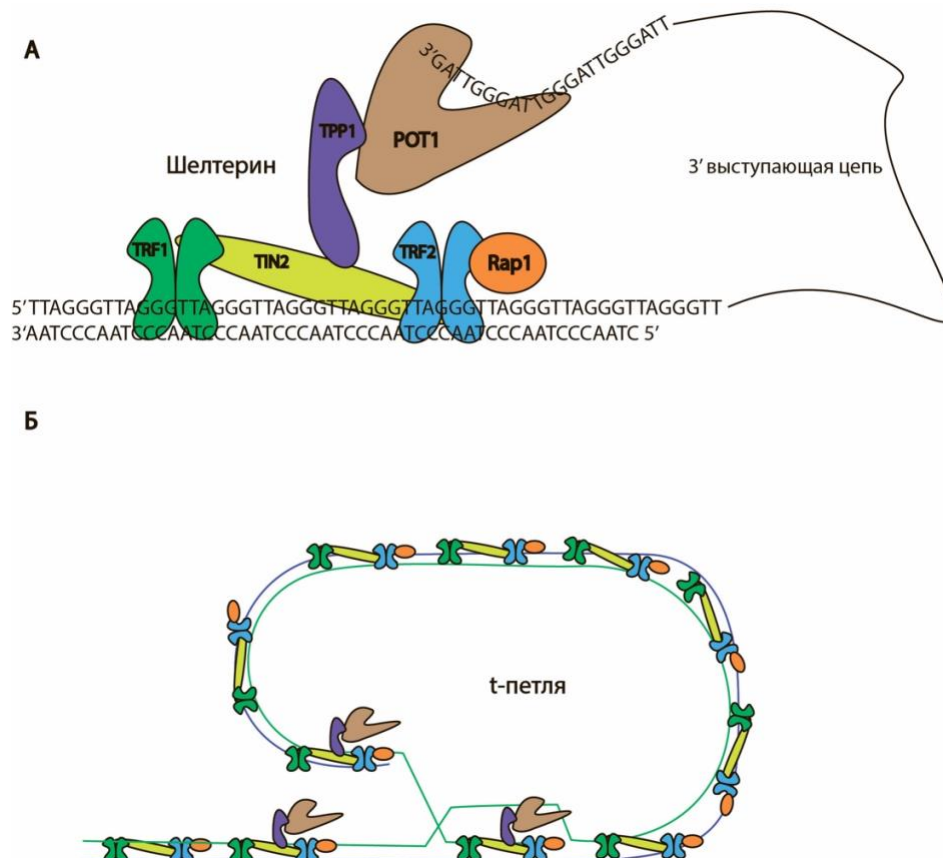


Рисунок 2. Структура и функции шелтерина.

А. Схематичное изображение белков, формирующих шелтериновый комплекс, и их взаимодействие с теломерой.

Б. Схема, иллюстрирующая формирование структуры t-петли.

Rap1 взаимодействует с TRF2. POT1 связывается с одноцепочечным участком теломер, а TPP1 опосредует взаимодействие POT1 с TIN2, тем самым способствуя образованию кольцевой структуры. TRFH-домен TRF2

способен накручивать на себя ДНК, вызывая локальное расплетание двойной спирали, что приводит к внедрению 3'-концевого одноцепочечного участка внутрь двуцепочечного и формированию так называемой теломерной петли (t-петли), представляющей собой структуру лассо (рис. 2Б). t-петли были выявлены *in vivo* в клетках HeLa, а также лейкоцитах мыши и человека методом электронной микроскопии [9]. В последствии существование t-петель было подтверждено *in vivo* в спленocyтaх мыши при помощи микроскопии высокого разрешения STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) [10].

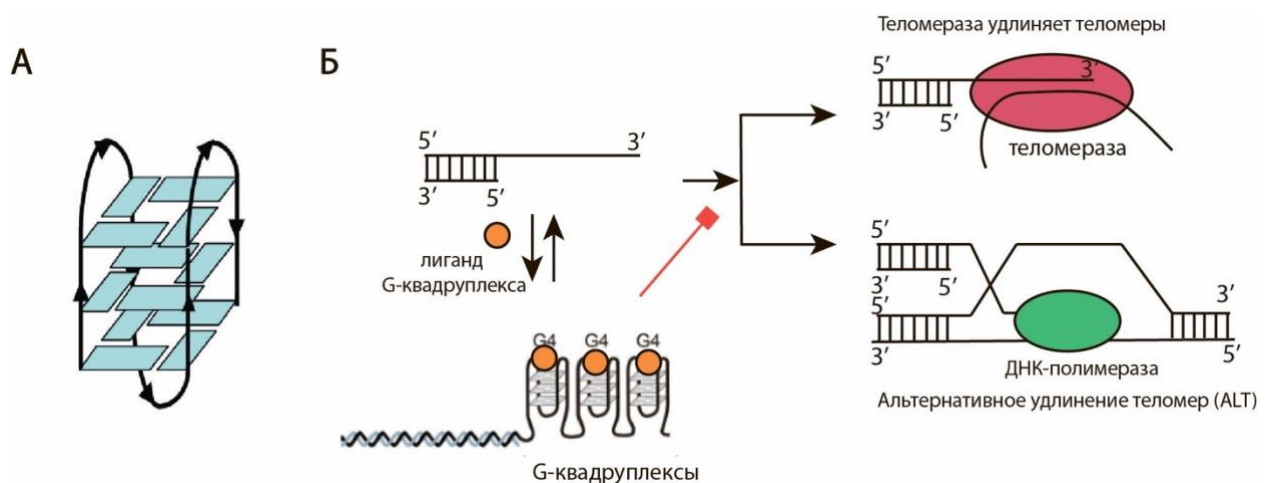


Рисунок 3. Теломерные последовательности способны образовывать G-квадруплексы.

А. Схематичное изображение одной из возможных конформаций G-квадруплекса, сформированного ДНК теломерной последовательности.

Б. Схема, иллюстрирующая роль структуры теломер в регуляции их функционирования.

G-богатый одноцепочечный участок теломерной ДНК способен формировать G-квадруплексы, что было подтверждено как *in vitro*, так и *in vivo* [11,12]. Структура G-квадруплекса образуется путем формирования 8 водородных связей между четырьмя остатками гуанина (рис. 3А). Формирование G-квадруплексов делает теломеру недоступной для удлинения теломеразой [13] и предотвращает рекомбинацию теломер при нарушении функционирования теломерных белков или в клетках, поддерживающих длину теломер при помощи гомологической рекомбинации (так называемый

ALT-механизм), и защищает концевые участки хромосом от деградации нуклеазами (рис. 2Б) [14]. Теломерный белок POT1, взаимодействуя с 3'-концевым участком теломеры, способен расплетать G-квадруплексы [15], что делает теломеру доступной для теломеразы. При этом сам POT1 может блокировать взаимодействие теломеразы с теломерой в случае его связывания на самом 3'-конце хромосомы [16].

Белки, не входящие в состав шелтеринового комплекса, вовлечены в процессы регуляции структуры теломер, а также их доступности для теломеразы, т.е. возможности быть удлиненными. Продemonстрировано, что RPA взаимодействует с теломерами *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) [17]. Оказалось, что RPA человека расплетает теломерные G-квадруплексы *in vitro* [18]. Взаимодействие RPA с теломерами способствует стабилизации структуры 3'-концевого участка теломер в одноцепочечном состоянии, являющимся наиболее удобным субстратом для удлинения теломеразой. Можно предположить регуляторную роль RPA в механизмах поддержания длины теломер.

Недавно установлена транскрипционная активность теломерных областей генома [19,20]. Оказалось, что промоторные участки, расположенные в субтеломерных областях (областях генома, прилежащих к теломерам), служат точками начала транскрипции молекул РНК, названных TERRA (Telomeric Repeat-containing RNA). Транскрипцию TERRA осуществляет РНК-полимераза II, используя в качестве матрицы С-богатую цепь теломерной ДНК [21]. В результате образуются 5'-кепированные транскрипты длиной от 100 до 9000 н.о., начало которых соответствует субтеломерным областям, а последовательность 3'-концевого участка представляет собой G-богатые теломерные повторы [19,20]. Небольшая фракция TERRA полиаденилирована. Интенсивные исследования продемонстрировали, что TERRA локализуется как в теломерных областях, так и во внутренних участках генома (в межгенных и интронных областях) [22–26]. TERRA взаимодействует с различными белками и комплексами

вовлеченными в определение статуса хроматина, такими как H3K9me3, HP1, гистон-метилтрансфераза Suv39h1, хроматин-ремоделирующими комплексами (NoRC – Nucleolar remodeling complex), NuA гистон ацетил-трансферазным комплексом, SWI/SNF ремоделирующим нуклеосомы комплексом, PRC2 – polycomb repressive complex 2), что свидетельствует о ее участии в регуляции экспрессии генома. Взаимодействие TERRA с комплексом, узнающим ориджины репликации ORC1 (origin replication complex 1), свидетельствует о ее регуляторной роли в репликации теломерных участков хромосом [27].

Продemonстрировано, что структура TERRA важна для формирования комплексов с разными белками. PRC2 и TRF2 имеют высокое сродство к G-квадруплексам [22,28,29], формирование которых в структуре TERRA продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo* [30–32]. Взаимодействуя с теломерными участками генома, TERRA образует R-петли, представляющие собой РНК-ДНК-гибриды [33]. R-петли накапливаются на критически коротких теломерах [34], что, по-видимому, связано с регуляцией длины теломер и стабильности генома в ходе реализации различных механизмов, включая регуляцию статуса хроматина [35–37], инициации репликации и гомологичной рекомбинации теломерных участков [38,39].

Безусловно, TERRA принимает участие и в регуляции работы теломеразы. Известно, что *in vitro* комплекс TERRA-hnRNP A способствует взаимодействию POT1 с теломерами, высвобождая одноцепочечную часть ДНК из комплекса с RPA [40]. Прямое взаимодействие TERRA с теломеразой за счет непосредственного связывания с матричным участком теломеразной РНК должно ингибировать фермент [41], что подтверждается данными о снижении активности теломеразы человека [42] и мыши [41] *in vitro* в присутствии TERRA-подобных олигонуклеотидов и об активации теломеразы в условиях обработки стволовых клеток эмбриона мыши (mESC) антисмысловыми олигонуклеотидами (TERRA-ASO) [43].

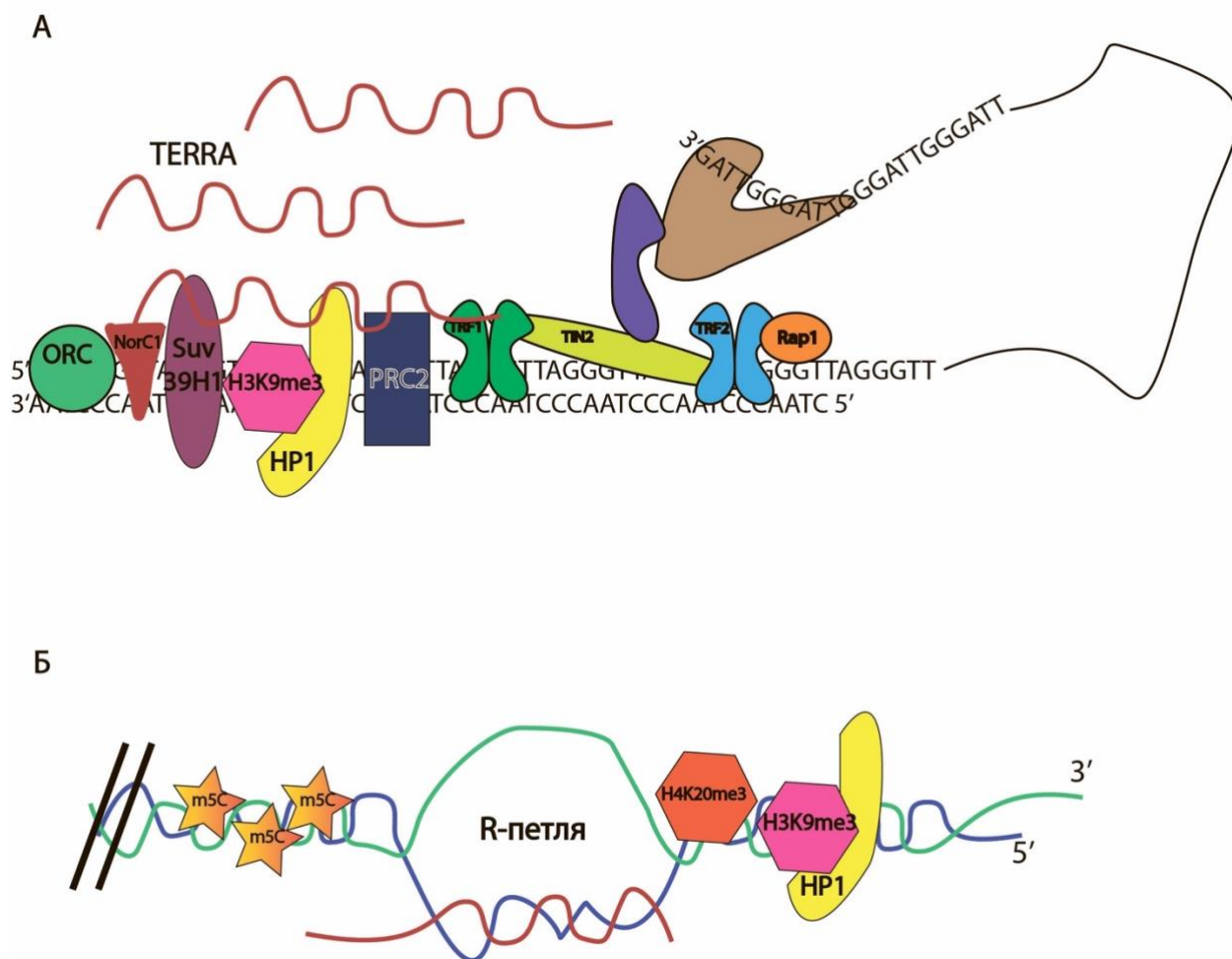


Рисунок 4. TERRA участвует в организации и регуляции теломерного хроматина.

А. TERRA взаимодействует с теломер-ассоциированными белками, включая TRF2, Suv39H1 и ORC1.

Б. TERRA формирует R-петли -- ДНК-РНК-гетеродуплексы, участвующие в регуляции статуса хроматина в теломерных участках хромосом. Рисунок адаптирован из [27].

1.1.2. Структура теломеразы

Теломераза -- рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс, основными компонентами которого являются РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) и теломеразная РНК. Теломеразная обратная транскриптаза достраивает теломеры, используя в качестве матрицы внутренний участок теломеразной РНК. Критичными для взаимодействия компонентов теломеразы и теломеразной активности элементами теломеразной РНК являются псевдоузел (t/РК), содержащий матричный участок для синтеза

теломерных повторов, а также консервативные участки 4 и 5 (CR4/5) [44,45]. Консервативный участок CR4/5 содержит стебли P5 и P6, а также критически важную для активности фермента шпильку P6.1. Важным структурным элементом теломеразной РНК человека является 3'-концевой Н/АСА-домен, в состав которого входит CR4/5 участок и САВ-бокс (рис. 5А, 6). Совместно с TERT эти домены входят в состав минимального функционального фермента, способного добавлять теломерные повторы к субстрату. TERT состоит из 4-х доменов: N-концевой домен (TEN), РНК-связывающий домен (TRBD), обратнo-транскриптазный домен (RT) и С-концевой домен (CTD) (рис. 5Б, 6). TRBD TERT взаимодействует с CR4/5 доменом hTR (рис. 7). Критичную роль в этом взаимодействии, а также последующем катализе играет Р6.1 шпилька (рис. 6) [44,46,47].

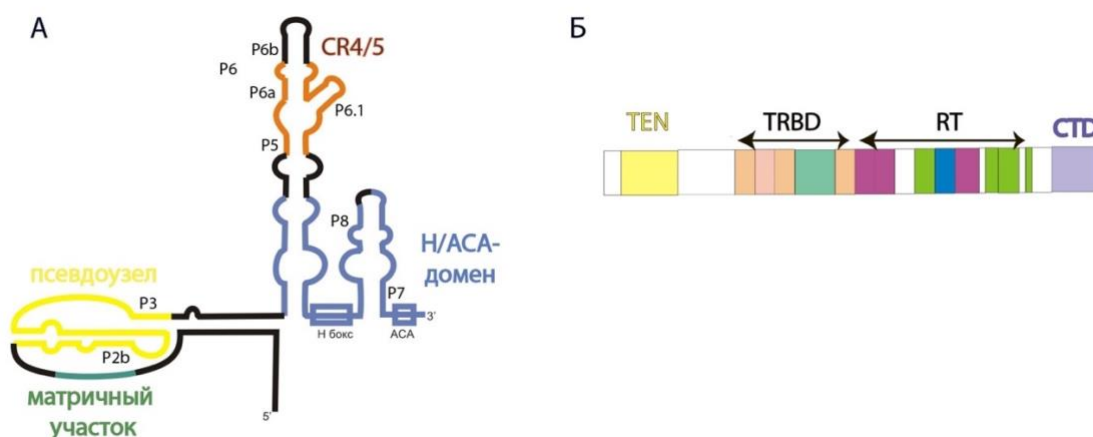


Рисунок 5. Структуры коровых компонентов теломеразы человека.

А. Схематичное изображение вторичной структуры теломеразной РНК человека.

Б. Схема, иллюстрирующая доменную организацию обратной транскриптазы теломеразы человека. TEN – N-домен, TRBD – теломеразный РНК-связывающий домен, RT – обратнo-транскриптазный домен, CTD – С-концевой домен.

Мутации, разрушающие шпильку Р6.1, приводят к нарушению взаимодействия TERT с hTR, а также снижению теломеразной активности [45,48]. Компенсаторные мутации восстанавливают шпилечную структуру и

теломеразную активность. Оказалось, что для функционирования теломеразы важна не только шпильчатая структура домена Р6.1, а также ее длина.

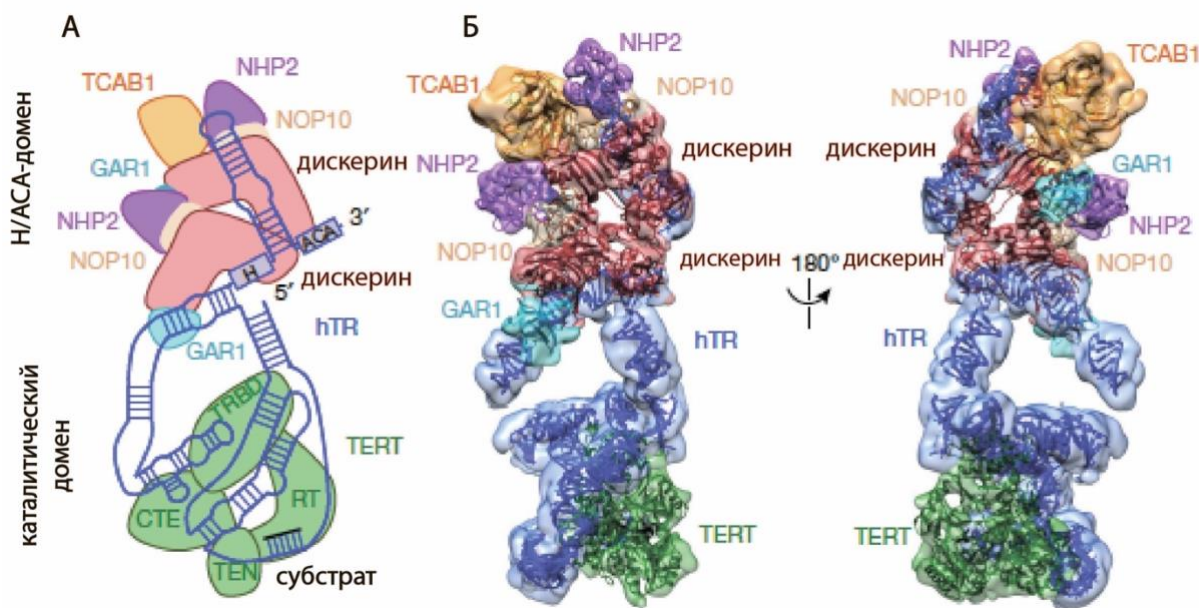


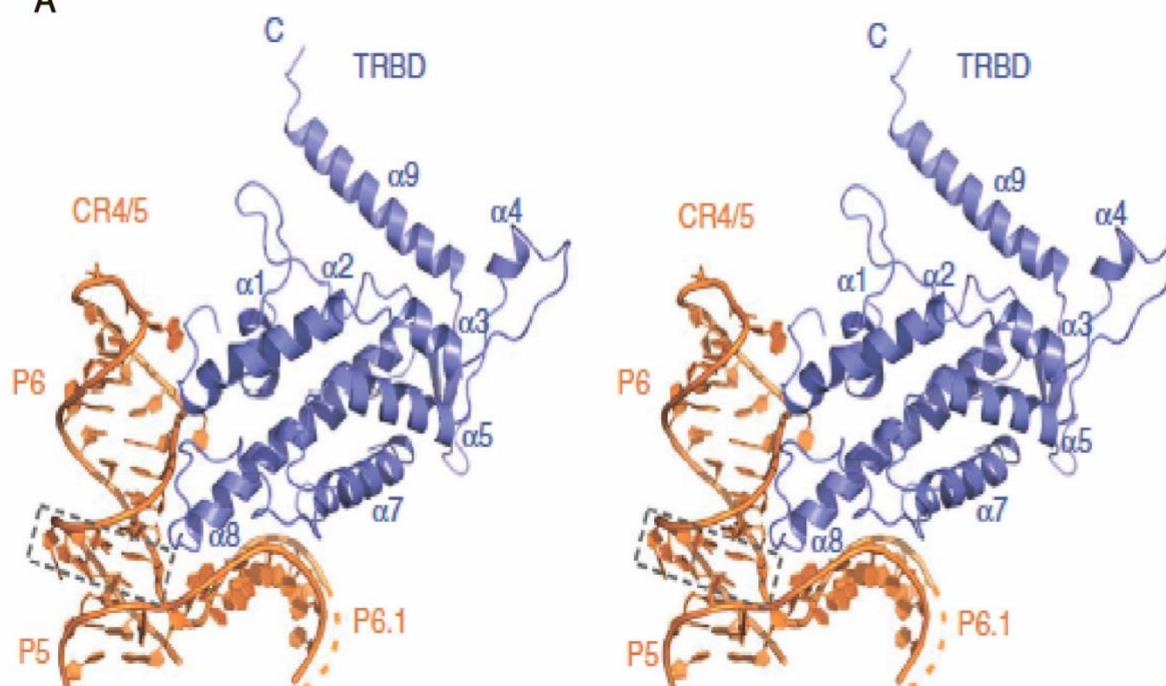
Рисунок 6. Структура комплекса теломеразы человека с субстратом, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Рисунок адаптирован из [49].

А. Схема, иллюстрирующая расположение компонентов в комплексе.

Б. Проекция структур, реконструированные из данных криоэлектронной микроскопии. Показаны каталитический и Н/АСА-домены.

В структуре теломеразных РНК позвоночных выделяют дополнительный важный для функционирования элемент, так называемый scaРНК-домен (домен, специфичный для малых РНК телец Кахаля) [50]. scaРНК похожи на малые ядрышковые РНК (мяоРНК), которые участвуют в посттранскрипционной модификации рибосомных РНК и малых ядерных РНК, вовлеченных в сплайсинг [51]. В состав scaРНК-домена входит Н/АСА-элемент, важный для сборки теломеразы, а также стабилизирующий hTR (рис. 5А, 6). Шпилька, находящаяся на самом 3'-конце hTR, является САВ-боксом, отвечает за транспорт теломеразы в тельца Кахаля, где осуществляется модификация и сборка клеточных РНП [52–54].

А



Б

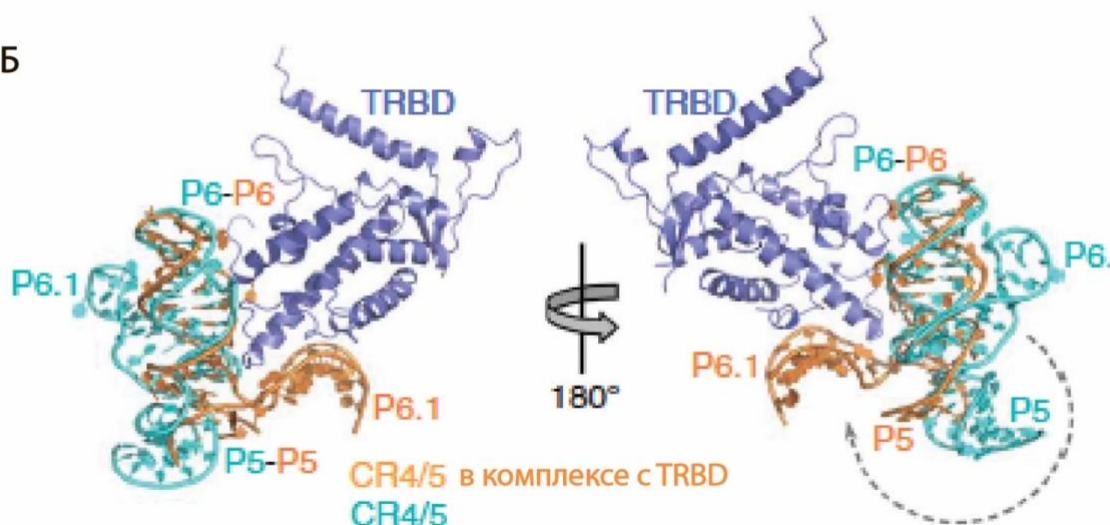


Рисунок 7. Структура комплекса TRBD-домена TERT и CR4/5-домена TERC. Адаптировано из [47].

А. Стерео-проекция структуры CR4/5-TRBD-комплекса. CR4/5 окрашен в оранжевый цвет, TRBD – в фиолетовый.

Б. Соотнесение структур свободного CR4/5-домена и его комплекса с TRBD.

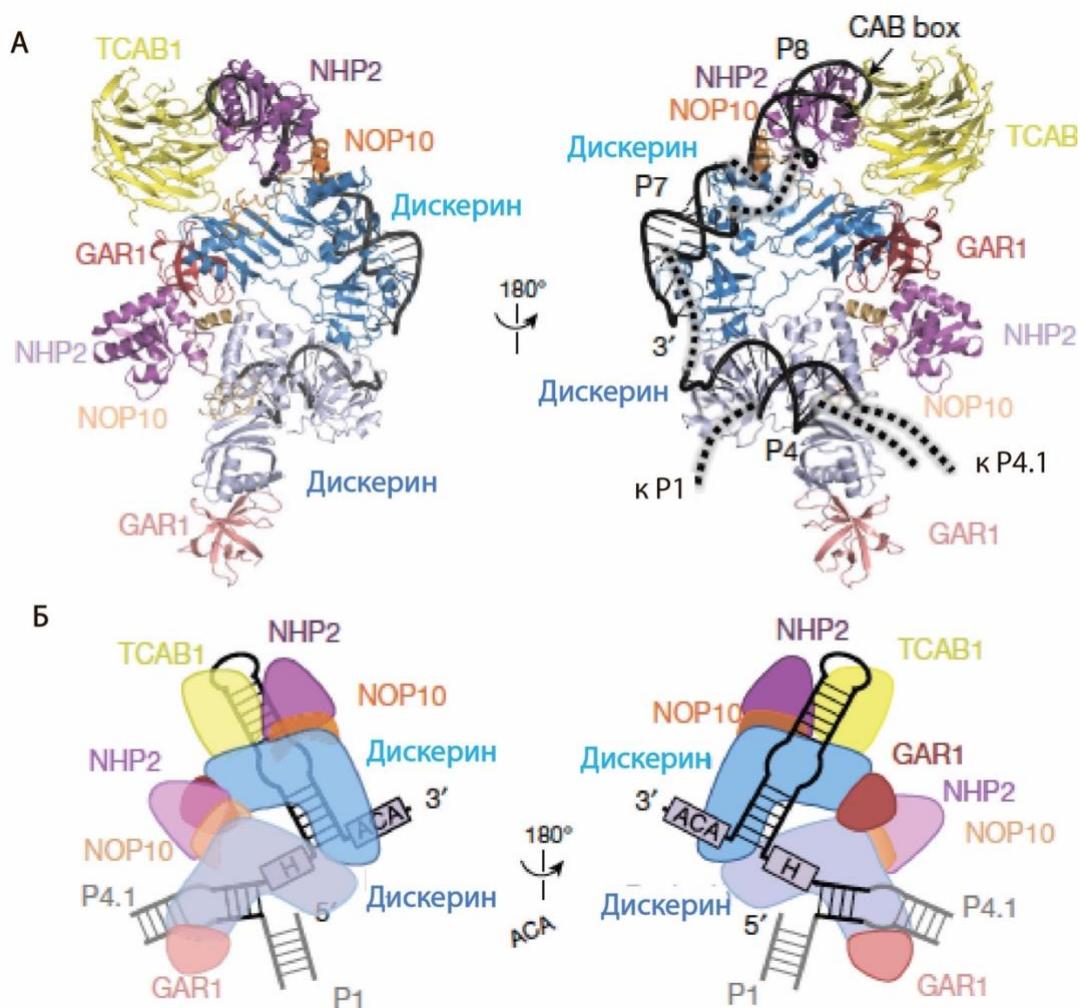


Рисунок 8. Структура комплекса Н/АСА-белков с Н/АСА-доменом теломеразной РНК человека. Рисунок адаптирован из [49].

А. Две проекции Н/АСА-комплекса в структуре теломеразы человека, полученной методом криоэлектронной микроскопии. TCAB1 обозначен желтым цветом, дискерин – голубым, GAR1 – красным, NOP10 – оранжевым, NHP2 – фиолетовым и теломеразная РНК – черным. Б. Схема, иллюстрирующая расположение компонентов в Н/АСА-комплексе.

Сборка теломеразного комплекса в клетках человека начинается со взаимодействия вновь синтезированной hTR с Н/АСА-белками и их шаперонами [55]. В состав активного теломеразного комплекса входят по две молекулы дискерина, NOP10, NHP2 и GAR1, а также одна молекула TCAB1, необходимого для локализации фермента в тельцах Кахаля, где происходит взаимодействие теломеразы с теломерами (рис. 6).

Два гетеротетрамера Н/АСА-белков взаимодействуют с Н/АСА-элементом hTR в двух положениях: один набор связан с P4-шпилькой

исключительно через молекулу дискерина, а второй набор образует более стабильное взаимодействие со шпильками P7 и P8. Дискерин взаимодействует со шпилькой P7, а белки NOP10, NHP2 и TCAB1 связывают шпильку P8 (рис. 6, 8) [49].

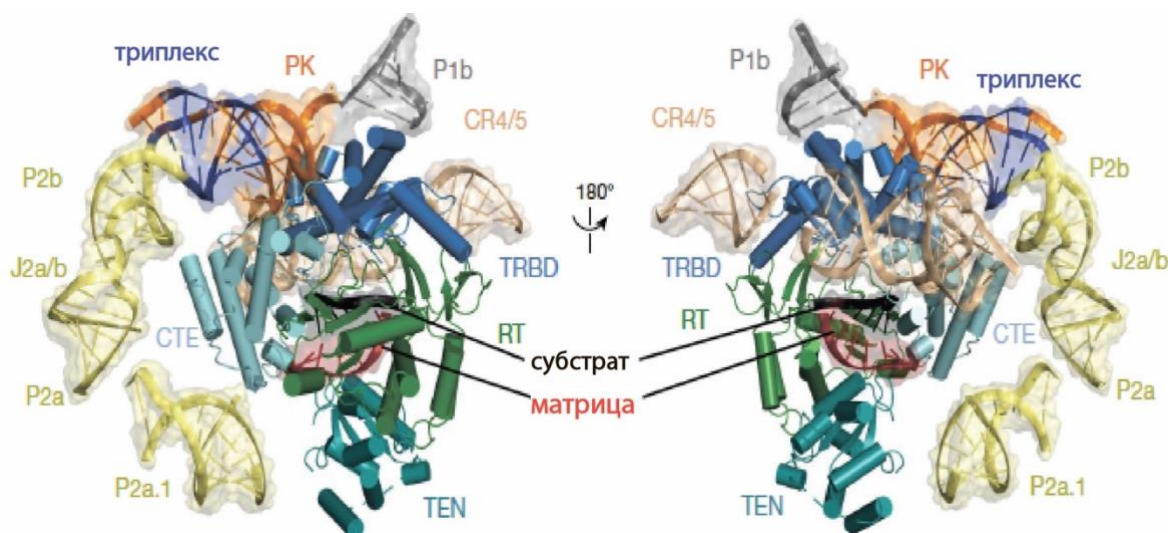


Рисунок 9. Структура активного центра теломеразы человека, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Рисунок адаптирован из [49].

Для образования активного каталитического центра псевдоузел РК и CR4/5-домен оборачиваются вокруг TERT. РК образует жесткую аркообразную структуру, в которой, образующийся триплекс из P2b и P3 шпилек, сближает в пространстве TRBD- и CTE-домены TERT. Матричный участок располагается вблизи TEN-домена, что подтверждает участие последнего в стабилизации 3'-концевой части РНК-ДНК-дуплекса, образуемого теломерой и теломеразной РНК (рис. 9) [49].

CR4/5-домен состоит из шпилек P5, P6 и P6.1, образующих структурный элемент TWJ (three-way junction). P6a стебель расположен вдоль TRBD, а P6.1 выпетливается из TWJ перпендикулярно P6a, располагаясь между TRBD и CTE-доменами TERT. Шпилька P5 образует коаксиальное стекинг взаимодействие с P6a, не затрагивая TERT [49]. P6.1 шпилька критичная для функционирования фермента располагается напротив CTE, что подтверждает данные о стабилизации этой петли CTE-доменом TERT (рис. 7) [56].

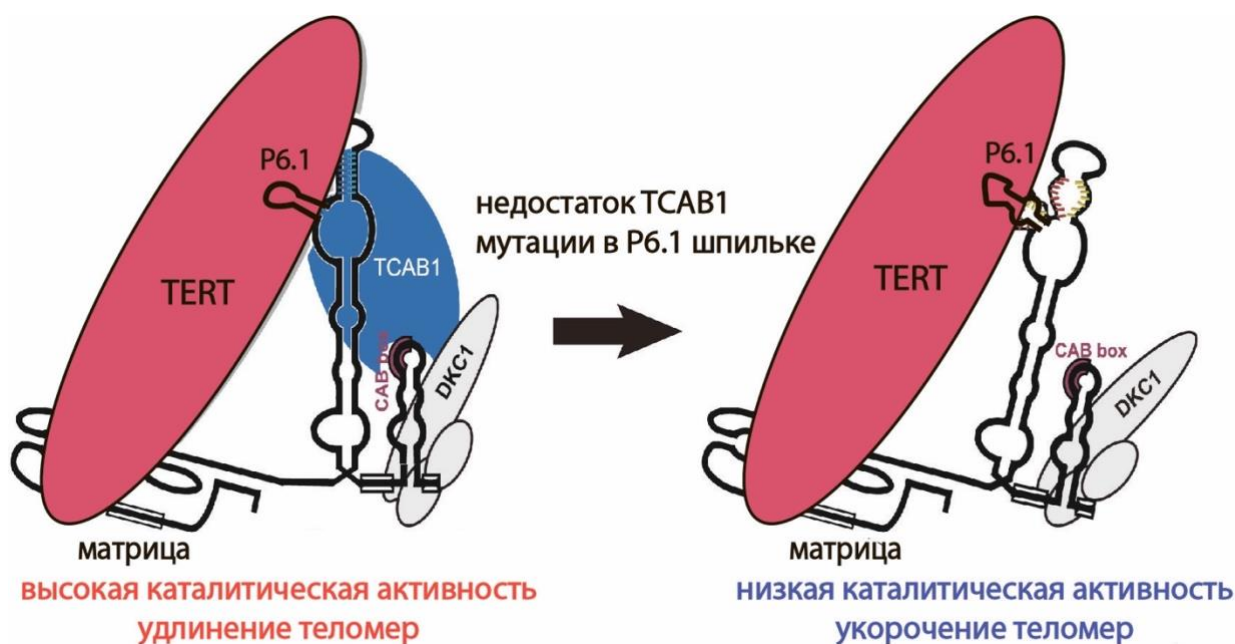


Рисунок 10. Связывание TCAB1 стимулирует активность теломеразы. Схематичное изображение влияния TCAB1 на структуру шпильки Р6.1 и активность теломеразы.

Интересно, что взаимодействие TCAB1 абсолютно необходимо для формирования каталитически активного теломеразного комплекса. В отсутствии TCAB1 фермент собирается, но обладает низкой активностью. Оказалось, что связывание TCAB1 с hTR необходимо для формирования третичной структуры CR4/5-домена, предпочтительной для связывания с TERT. Отсутствие TCAB1 или мутации в гене этого белка или CR4/5-домене теломеразной РНК приводят к нарушению взаимодействия TERT с hTR, снижению теломеразной активности и укорочению теломер в стволовых клетках эмбриона человека (рис. 6, 10) [57].

1.1.3. Взаимодействие теломеразы с теломерами

Основной функцией теломеразы является удлинение теломер, которое обеспечивается полимеризующей активностью теломеразной обратной транскриптазы. TERT достраивает теломерные повторы, используя в качестве затравки 3'-гидроксильную группу выступающего одноцепочечного конца теломеры. Матрицей для синтеза теломерных повторов является внутренний

попытки исследования, место сборки теломеразного РНП остается неизвестным. Сборка теломеразного РНП в ядрышке продемонстрирована в условиях повышенной экспрессии гена теломеразной обратной транскриптазы и снижения уровня H/АСА-белков. В условиях отсутствия TCAB1 белка не требуется активации экспрессии гена TERT для образования активного фермента в ядрышке [61]. В настоящий момент не исключают, что каталитически-активный теломеразный комплекс может формироваться как в тельцах Кахаля, так и в нуклеоплазме.

TCAB1 взаимодействует как с активным, так и с неактивным теломеразным комплексом и способствует его перемещению из ядрышек в нуклеоплазму и тельца Кахаля в G1-фазе клеточного цикла [60,62,63]. Мутации в гене коилина, приводящие к отсутствию телец Кахаля, не влияют на сборку активного теломеразного комплекса и длину теломер в раковых и эмбриональных стволовых клетках [52,61], что свидетельствует об эффективном взаимодействии теломеразы с теломерами в нуклеоплазме. Локализация в живой клетке теломеразы, теломер и телец Кахаля с использованием метода флуоресцентной микроскопии убедительно демонстрирует, что взаимодействие теломеразы с теломерами происходит в S-фазе клеточного цикла в нуклеоплазме, а не в тельцах Кахаля [64].

Для взаимодействия теломеразы с теломерами позвоночных необходим белок TPP1 (рис. 11). Структурный OB-домен (oligosaccharide/oligonucleotide-binding) белка TPP1 связывается с TEN-доменом теломеразной обратной транскриптазы [65], позиционируя РНП на одноцепочечном участке теломер, способствуя взаимодействию матричного участка теломеразной РНК с концевым участком хромосомы. Косвенные данные свидетельствуют о взаимодействии TPP1 со специфическим для TERT IFD-доменом [66].

1.1.4. Удлинение теломер

Взаимодействие теломеразы с теломерой позволяет выполнять ферменту основную каталитическую функцию – удлинение теломер.

Теломераза обладает полимеризующей активностью, в результате осуществления которой происходит добавление дезоксирибонуклеотидов к 3'-ОН группе 2'-дезоксирибозы последнего нуклеотида теломеры с образованием фосфодиэфирной связи. Каждый следующий дезоксирибонуклеотид встраивается по принципу комплементарности матричному участку, входящей в состав фермента, теломеразной РНК. Для описания эффективности работы теломеразы введены термины процессивности I- и II-типа. Процессивность I-типа описывает количество добавленных нуклеотидов без диссоциации комплекса теломеразы-теломеры. После добавления каждого следующего нуклеотида комплекс теломеразы с теломерой может диссоциировать [67]. Максимальная длина РНК-ДНК-дуплекса между теломеразной РНК и теломерой у человека составляет 11 нуклеотидов. Для эффективной работы теломеразы длина дуплекса должна быть ограничена 5-6 нуклеотидами [68]. Формирование более длинного дуплекса будет предотвращать транслокацию теломеразы относительно РНК-ДНК-дуплекса и ингибировать ее активность в режиме добавления повторов. Количество добавленных теломерных повторов к одной теломере без диссоциации продукта описывается процессивностью II-типа. Для обеспечения процессивности I-типа после добавления каждого нуклеотида происходит расплавление гибрида матрица-продукт и ступенчатая транслокация теломеразы. Процессивность II-типа обеспечивается последовательностью событий: после достижения определенной длины РНК-ДНК-дуплекса происходит разделение его цепей, перемещение матричного участка теломеразной РНК относительно теломеры, отжиг матричного участка на 3'-конце теломеры и позиционирование гетеродуплекса в активном центре фермента (рис. 12). Последние структурные исследования теломеразы позволяют предположить, что TEN-домен обратной транскриптазы ограничивает длину гетеродуплекса по неизвестному механизму [49,69]. Теломерный белок TRP1 стимулирует транслокацию и снижает эффективность диссоциации комплекса теломеразы с теломерой [70],

увеличивая таким образом количество теломерных повторов, добавленных без диссоциации комплекса (рис. 12).

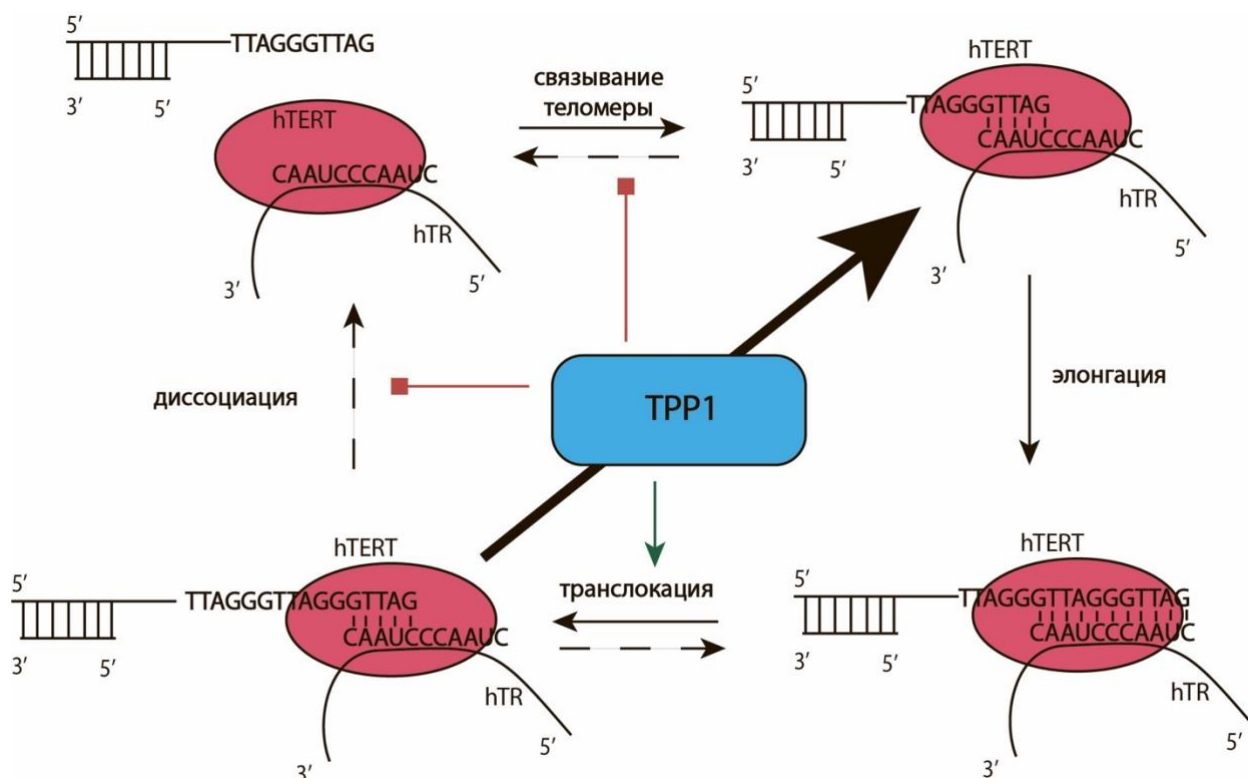


Рисунок 12. Каталитический цикл теломеразы. Схематичное изображение цикла работы теломеразы и его модуляции белком TPP1.

1.2. Биогенез теломеразной РНК

Теломеразная РНК абсолютно необходима для удлинения теломер теломеразой. Молекулы теломеразных РНК из различных организмов отличаются друг от друга длиной и первичной структурой, что не мешает им образовывать основные домены трехмерной структуры необходимые для функционирования фермента [71]. Транскрипцию гена теломеразной РНК человека *hTERC* осуществляет РНК-полимераза II [72]. Вблизи положения старта транскрипции расположены консенсусные области 5'-ССААТ- 3' и 5'-ТАТА- 3'. Минимальная длина промотора необходимая для транскрипции составляет 272 п.н., а максимально эффективную транскрипцию обеспечивает последовательность от -463 п.н. до точки начала транскрипции. В регуляции

транскрипции теломеразной РНК человека участвуют транскрипционные факторы NF-Y- и ETS-семейств [72].

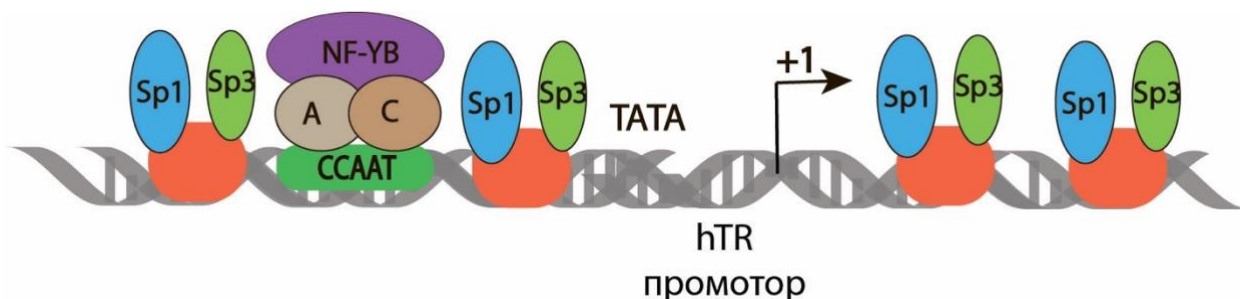


Рисунок 13. Схематичное изображение промоторной области гена теломеразной РНК человека. Отмечены участки связывания факторов транскрипции и основные регуляторные элементы.

С консенсусным участком 5'-CCAAT-3' взаимодействует NF-Y, являющийся основным регулятором транскрипции гена теломеразной РНК. Гетеротример, состоящий из субъединиц NF-YA, NF-YB и NF-YC, привлекает РНК-полимеразу II к участку взаимодействия, мутации которого инактивируют экспрессию гена *hTERC* [73,74].

Белки Sp1 и Sp3, относящиеся к семейству транскрипционных факторов ETS, взаимодействуют с 4 участками в промоторной области гена теломеразной РНК человека: 2 участка расположены после старта транскрипции (в теле гена), один между 5'-CCAAT-3' и 5'-TATA-3'-последовательностями и еще один раньше 5'-CCAAT-3'-блока [75]. Применение метода мутационного анализа выявил неравнозначный вклад участков узнавания транскрипционных факторов семейства ETS в регуляцию экспрессии гена теломеразной РНК человека [72]. Оказалось, что мутации одновременно двух участков, расположенных после старта транскрипции, приводят к активации экспрессии гена, а мутации всех четырех участков не влияют на уровень транскрипции теломеразной РНК человека [76].

Взаимодействие комплекса белка ретинобластомы (pRb) и транскрипционным фактором E2F с 5'-CCAAT-3'-последовательностью

промоторного участка необходимо для эффективной транскрипции гена теломеразной РНК человека. Мутации в pRb, нарушающие его взаимодействие с E2F, приводят к инактивации экспрессии *hTERC* [75].

В регуляции экспрессии гена теломеразной РНК человека посредством модуляции активности факторов транскрипции Sp1 и Sp3 участвует комплекс митоген-активируемой протеинкиназы киназы 1 (MEKK1) с c-Jun-NH2-киназы (JNK). Обработка клеток специфическим ингибитором JNK активирует транскрипцию гена теломеразной РНК человека в клетках дикого типа, а также снимает репрессию транскрипции в случае экзогенной экспрессии активного киназного домена MEKK1. Совместная экспрессия генов MEKK1 и JNK дикого типа усиливает ингибирование транскрипции гена *hTERC*, оказываемое одним активным киназным доменом MEKK1. Оказалось, что обработка клеток ингибитором JNK влияет на взаимодействие Sp1 и Sp3 с промотором гена теломеразной РНК человека, увеличивая количество Sp1 в этом комплексе. JNK-киназа, по-видимому, усиливает взаимодействие Sp3 с промотором гена теломеразной РНК человека [77].

Убиквитинлигаза Mdm2, регулирующая стабильность p53, а также образование комплекса pRb/E2F, влияет на активность промотора гена теломеразной РНК человека [74]. Mdm2 взаимодействует с Sp1 *in vitro* и *in vivo*, что приводит к ингибированию активности регулируемых этим фактором промоторов. В случае промотора гена теломеразной РНК человека наблюдали инактивацию действия факторов транскрипции pRb, NF- Υ и Sp1 [78].

Фактор транскрипции, участвующий в ответе клеток на условия гипоксии (HIF-1), активирует экспрессию гена теломеразной РНК человека в 2 раза в течение 6 часов, с последующим восстановлением уровня экспрессии. Промотор гена теломеразной РНК человека содержит последовательность, с которой в условиях гипоксии взаимодействует комплекс HIF-1, EP300, TFIIB и РНК-полимеразы II [79]. Регуляция экспрессии гена теломеразной РНК человека при гипоксии может реализовываться в условиях развития опухолевого процесса, когда интенсивная пролиферация клеток приводит к

формированию областей с пониженным содержанием кислорода, а также характеризующихся склонностью к формированию устойчивости опухоли к терапии.

Активация промотора гена теломеразной РНК человека белком E1A аденовируса при участии Sp1 показана в опытах с использованием репортерных конструкций на основе люциферазы. Белок CtBP нивелирует активацию промотора белком E1A, не влияя на экспрессию гена теломеразной РНК человека в обычных условиях [76].

Статус метилирования промоторных областей генов влияет на экспрессию генов. Показано, что промотор гена теломеразной РНК человека метилирован в образцах теломераза-положительных и гиперметилирован в образцах теломераза-негативных клеточных линий. Метилирование промоторной области гена теломеразной РНК человека в образцах опухолей не обнаружено. По-видимому, регуляция экспрессии *hTERC* в процессе онкогенеза осуществляется при помощи других механизмов [80].

В результате транскрипции гена теломеразной РНК человека образуется набор первичных транскриптов различной длины [81]. Отсутствие информации о положении участка терминации транскрипции гена *hTERC* затрудняет установить истинную длину первичного транскрипта. Применение методов глубокого секвенирования позволило выявить набор транскриптов дискретной длины [82]. Основная фракция транскриптов теломеразной РНК человека соответствует ее зрелой форме и имеет длину 451 н.о. Дополнительно выявлена фракция продуктов, удлинённых на 5-6 нуклеотидов, закодированных в геноме, и ограниченных с 3'-конца олиго(А)-последовательностью [82]. Эта фракция содержит промежуточные стабильные интермедиаты, образующиеся в результате процессинга первичных транскриптов (рис. 14). Фракция транскриптов дискретной длины вплоть до удлинённых на 1000 н.о., по-видимому, соответствует продуктам быстрого процессинга длинного первичного транскрипта [81].

Установлено, что теломеразную РНК человека, несмотря на ее структурное сходство с мяоРНК, синтезирует РНК-полимераза II [50]. Интересно, что природа промотора влияет на корректность и эффективность процессинга теломеразной РНК человека. Корректно ее процессинг осуществляется в случае использования нативного промотора или промотора U3 мяРНК. Использование вирусного CMV-промотора или промотора U1 мяРНК, синтез которой осуществляет РНК-полимераза III, приводит к накоплению транскрипта hTERC некорректной длины [83].

Экспериментальные данные, полученные в исследованиях последних лет, позволяют утверждать, что количество теломеразной РНК человека в клетке поддерживается на постоянном уровне. Установлено, что в процессе созревания теломеразной РНК человека осуществляется конкуренция между механизмами деградации РНК при участии экзосом и стабилизации с образованием «зрелой» формы TERC. Для образования «зрелой» формы теломеразной РНК человека необходимо взаимодействие H/ACA-белков: дискерина, NOP10, NHP2 и GAR1 с H/ACA-шпилькой hTERC [84]. Формирующийся комплекс стабилизирует теломеразную РНК человека и защищает ее от 3'-концевой деградации в процессе созревания при помощи экзосом, аналогично мяоРНК, содержащих H/ACA-мотивы. В процессе созревания РНК, опосредуемом экзосомой, участвуют несколько комплексов. Комплекс TRAMP (TRF4, ZCCHC7 и MTR4) деградирует некодирующие РНК и абберрантные транскрипты в ядрышке [85,86]. При этом TRF4 обеспечивает олигоаденилирование транскрипта, который затем подвергается деградации экзосомой. Комплекс NEXT (RBM7, ZCCHC8 и MTR4), взаимодействуя с кеп-связывающим комплексом (CBC), образует комплекс CBCN и осуществляет котранскрипционный кеп-зависимый 3'-процессинг или деградацию РНК в ядре, привлекая экзосому на активно транскрибируемые РНК и так называемые PROMoter uPstream Transcripts (PROMPTs), синтез которых начинается перед промоторами кодирующих генов (рис. 14). Мутации в гене

Исследования созревания теломеразной РНК человека показали, что комплексы NEXT и TRAMP вовлечены в реализацию ее процессинга. Нокдаун гена *PARN1* (poly(A)ribonuclease 1) способствует накоплению непроцессированного олигоаденилированного интермедиата теломеразной РНК человека при снижении общего количества hTERC в клетках [86,87]. Мутации в гене *PARN1* ассоциированы с развитием дискератоза, заболевания, характеризующегося короткими теломерами [90]. Комплекс CBCA, в состав которого входят CBC и ARS2, привлекает PARN1 на олигоаденилированный промежуточный интермедиат теломеразной РНК человека. В созревании

теломеразной РНК человека принимает участие PABPN1 (poly(A)-binding protein N1), взаимодействие которого с олигоаденилированным интермедиатом способствует защите последнего от деградации экзосомой, а также привлекает PARN1 и стимулирует процессинг транскрипта (рис. 14) [81,91].

Общая схема процессинга теломеразной РНК выглядит следующим образом. Синтезированный длинный первичный транскрипт претерпевает кеппирование и взаимодействует с комплексом Н/АСА-белков, которые защищают РНК от деградации, способствуют формированию правильной третичной структуры, локализации транскрипта, а также определяют границу зрелой формы теломеразной РНК [92]. Корректному процессингу подвергается фракция транскриптов, связанных с комплексом Н/АСА-белков. Первичные транскрипты, не образовавшие комплекс с дискерином и другими шаперонами, подвергаются деградации комплексом TRAMP с экзосомой. В процессе созревания теломеразной РНК человека CBCN-комплекс привлекает экзосому, которая укорачивает предшественник, пока не встретит преграду в виде Н/АСА-шпильки, стабилизированной Н/АСА-белками [81,91]. Остановка экзосомы происходит за 5-7 н.о. до истинной 3'-границы «зрелой» формы теломеразной РНК человека [82]. PAP α , PAP γ и TRF4 олигоаденилируют интермедиат [91]. Взаимодействие PABPN1 защищает олигоаденилированный промежуточный продукт от дальнейшей деградации экзосомой, а также привлекает PARN1, которая укорачивает интермедиат с образованием «зрелой» формы теломеразной РНК человека (рис. 14) [91]. В процессинге олигоаденилированного продукта, по-видимому, участвует и деаденилаза TOE1 [93].

Описанный механизм процессинга теломеразной РНК человека имеет множество этапов, общих с одним из механизмов созревания теломеразной РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В этом организме теломеразная РНК синтезируется с образованием двух форм: длинной полиаденилированной и короткой неполиаденилированной [94]. Короткая неполиаденилированная

форма подвергается процессингу, а судьба длинной формы в настоящий момент не изучена. Известно, что она не поддерживает активность теломеразы и, возможно, претерпевает созревание с образованием «зрелой» формы. В образовании короткой неполиаденилированной формы TLC1 принимают участие комплекс факторов терминации транскрипции Nrd1-Nab3-Sen1, специфичные для некодирующих РНК (рис. 15). Удаление участков связывания Nrd1 и Nab3 в гене *TLC1* приводит к накоплению полиаденилированной формы теломеразной РНК [95]. Комплекс Nrd1-Nab3-Sen1 взаимодействует с РНК-полимеразой II, кеп-связывающим комплексом, экзосомой и комплексом TRAMP [96]. Неканоническая поли(А)-полимераза TRF4, входящая в состав TRAMP, добавляет короткую олиго(А)-последовательность (рис. 15). Неструктурированный 3'-конец является субстратом для экзосомы, которая гидролизует его пока не встретит преграду на 3'-конце в виде комплекса Sm-белков, являющимся аналогом комплексу H/ACA-белков человека (рис. 15) [97–101]. Сходство механизмов процессинга теломеразной РНК человека и *S. cerevisiae* позволяет предполагать, что регуляция терминации транскрипции гена *hTERC* у человека может осуществляться схожим образом.

В процессе созревания теломеразная РНК *S. cerevisiae* подвергается триметилированию в ядрышке [102], а также экспорту из ядра в цитоплазму при участии Crm1/Xpo1, Mex67 и Dbp5/Rat8. После взаимодействия с белковыми субъединицами теломеразная РНК импортируется обратно в ядро уже в составе теломеразы (рис. 15) [103].

Небольшая фракция первичного транскрипта или промежуточных форм теломеразной РНК человека экспортируется из ядра в цитоплазму, подвергаясь декепированию белком DCP2 и деградации цитоплазматической 5'-3'-экзонуклеазой XRN1. Нокдаун дискерина и PARN1 приводит к накоплению теломеразной РНК человека в специфических тельцах в цитоплазме, названных cyTER (cytoplasmic TER) (рис. 14) [104].

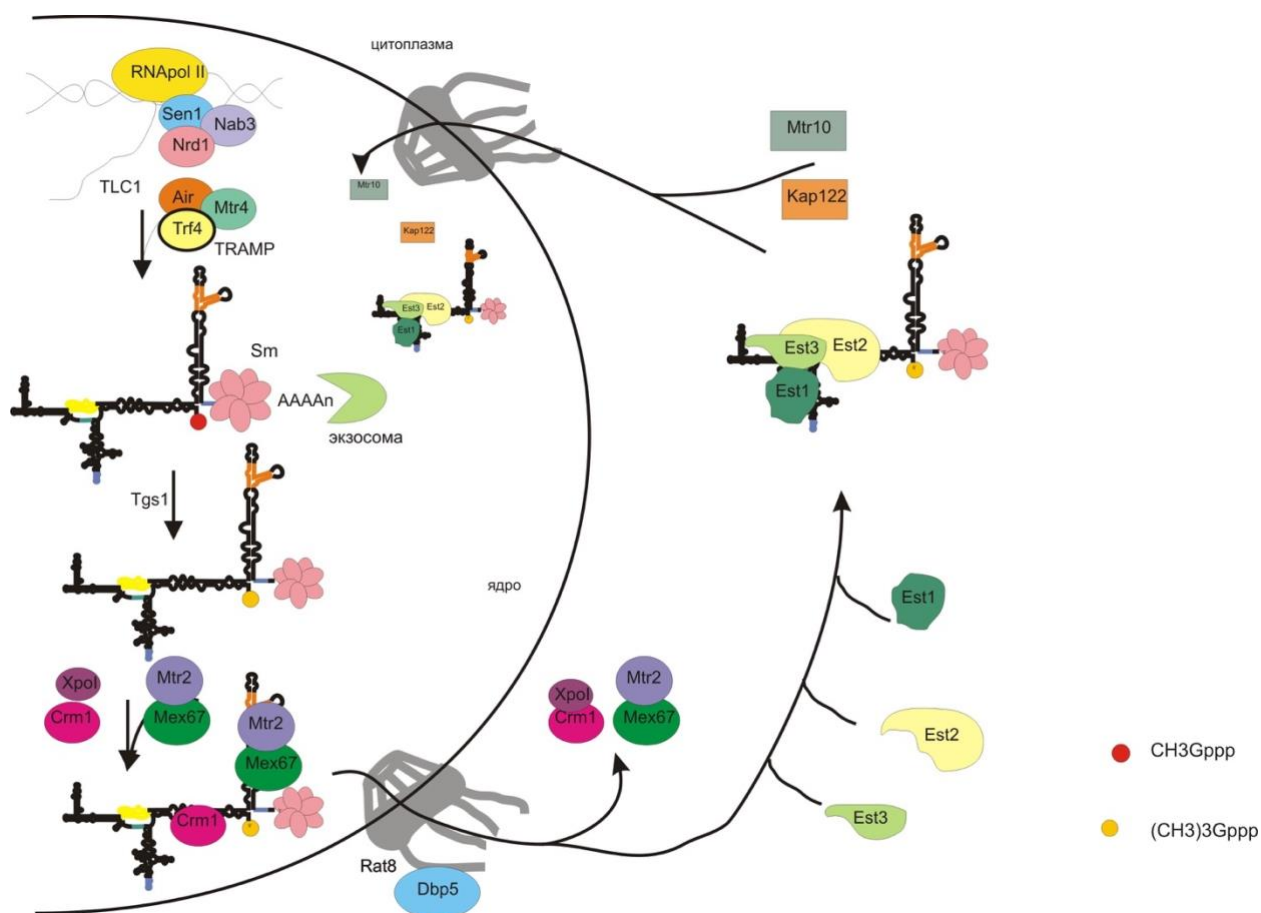


Рисунок 15. Схема, иллюстрирующая механизм процессинга и транспорта теломеразной РНК *S. cerevisiae* [88].

Сложная многоуровневая регуляция транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека свидетельствует о необходимости контроля количества теломеразной РНК в клетке. В результате конкуренции процессинга и деградации число молекул теломеразной РНК в клетке поддерживается на определенном уровне (около 1000 молекул на клетку линии HEK293T) [105].

1.3. Альтернативные функции теломеразной РНК

Основной функцией теломеразы является удлинение теломер и обеспечение таким образом неограниченного пролиферативного потенциала клеткам определенных типов [106]. Большинство исследований в области

теломеразы направлены на изучение механизмов старения и опухолеобразования. Теломераза активна в стволовых, половых, раковых клетках и клетках тканей с высокой скоростью регенерации. Известно, что в большинстве соматических клеток теломеразная активность отсутствует. В процессе эмбриогенеза происходит постепенная инактивация экспрессии гена теломеразной обратной транскриптазы *hTERT*, но не гена теломеразной РНК. Теломеразная РНК обнаружена в большинстве соматических клеток, где ген *hTERC* экспрессируется конститутивно [107], вне зависимости от активности теломеразы. Наличие активного теломеразного комплекса в большинстве раковых клеток позволяет утверждать, что теломераза, удлиняя теломеры, обеспечивает этим клеткам неограниченный пролиферативный потенциал, но исследования, направленные на выяснение роли компонентов теломеразы в механизмах опухолеобразования выявили и дополнительные функции компонентов фермента (рис. 16).

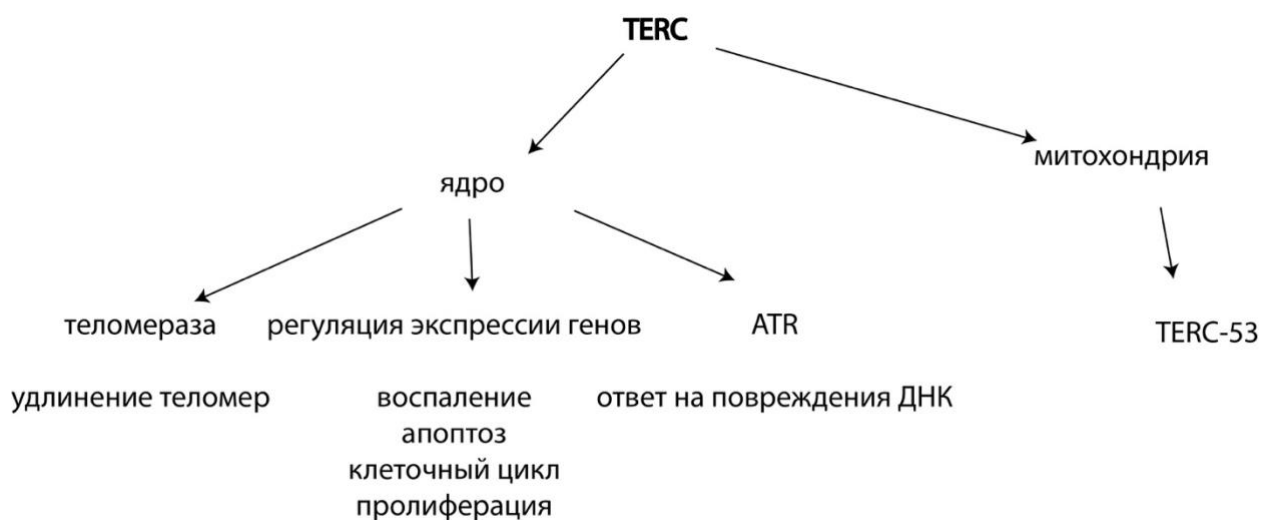


Рисунок 16. Функции теломеразной РНК в клетке.

1.3.1. Теломеразная РНК в онкогенезе

На начальных этапах исследования теломеразы были получены данные, позволяющие предполагать наличие дополнительных функций теломеразной РНК позвоночных в процессе опухолеобразования. Активация экспрессии

mTERC на ранних стадиях развития опухолей была продемонстрирована на двух моделях многостадийного опухолеобразования: K14-HPV16 и RIP-TAg2. У мышей модели K14-HPV16 происходит экспрессия ранних генов вируса папилломы человека типа 16 в базальных кератиноцитах, что позволяет наблюдать за мультистадийной индукцией плоскоклеточного рака эпидермиса. Мыши линии RIP1-TAg2 развивают карциному островковых клеток под контролем экспрессии SV40 Т-антигена в β -клетках поджелудочной железы. Оказалось, что на ранних стадиях развития этих типов опухолей происходит активация экспрессии *mTERC*, не связанная с активностью теломеразы [108].

Повышение уровня экспрессии *hTERC* в опухолях ранних стадий независимо от активации теломеразы позволяет предполагать дополнительные функции для теломеразной РНК. Исследования, проведенные на мышах линии K5-Tert, продемонстрировали, что экспрессия гена теломеразной РНК стимулирует процесс опухолеобразования, а также заживление ран независимо от длины теломер и активности теломеразы [109].

Оказалось, что кратковременное снижение уровня экспрессии *hTERC* при помощи РНК-интерференции приводит к быстрому замедлению клеточного цикла без изменения длины теломер. Ингибирование экспрессии гена теломеразной РНК человека не приводит к декепированию теломер и активации ответа на повреждения ДНК, но при этом наблюдается глобальное изменение экспрессии генов. Анализ дифференциальной экспрессии выявил быстрое снижение транскрипции генов белков, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, таких как циклин G2 и Cdc27 в условиях ингибирования экспрессии *hTERC* (рис. 16), а также генов, вовлеченных в процессы опухолеобразования, ангиогенеза и метастазирования, таких как интегрин αV и онкоген Met [110].

Двукратное усиление экспрессии гена интегрин αV наблюдается при экспрессии гена теломеразной РНК вируса болезни Марека (Marek's disease virus – MDV) в фибробластах курицы DF-1. Лимфотропный альфагерпесвирус

MDV вызывает заболевание кур, характеризующееся нейрологическими нарушениями, супрессией иммунной системы и развитием первичных злокачественных лимфом Т-клеток [111]. Оказалось, что геном MDV содержит две копии гена вирусной теломеразной РНК, последовательность которой на 88% совпадает с последовательностью теломеразной РНК курицы. Несмотря на то, что вирусная теломеразная РНК функционально активна и эффективно поддерживает теломеразную активность, ее онкогенный потенциал не зависит от активности фермента. Мутантная форма вирусной теломеразной РНК, которая не взаимодействует с теломеразной обратной транскриптазой курицы, демонстрирует такую же активность в процессе опухолеобразования, что и вирусная теломеразная РНК дикого типа [112]. Обнаружено, что белок RPL22, вовлеченный в активацию Т-клеток и индуцированную вирусом трансформацию клеток, взаимодействует с вирусной теломеразной РНК и теломеразной РНК курицы. Экспрессия вирусной теломеразной РНК приводит к релокализации RPL22 из ядрышка в нуклеоплазму. Предполагается, что экспрессия вирусной теломеразной РНК влияет на профиль экспрессии генов, активируя процессы опухолеобразования [112].

1.3.2. Теломеразная РНК как регулятор экспрессии генов

Потенциальная роль теломеразной РНК в глобальной регуляции экспрессии генома продемонстрирована в экспериментах по картированию участков, взаимодействующих с длинными некодирующими РНК [113]. Обнаружено 2198 положений в геноме отличных от теломерных участков, с которыми ассоциирована теломеразная РНК человека. Интересно, что теломеразная РНК человека взаимодействует с С-богатыми теломер-подобными мотивами генома, расположение которых напоминает участки узнавания факторов транскрипции. Оказалось, что TERC взаимодействует со многими участками регуляторных областей генов семейства *Wnt* и несколькими генов семейства *Мус*, связывание которых TERT показано ранее

[114]. Можно предположить, что именно TERT обеспечивает взаимодействие TERC с ДНК. Однако, С-богатая последовательность и теломер-подобные мотивы в местах связывания TERC с хроматином позволяют предположить, что TERC обеспечивает или усиливает взаимодействие TERT с ДНК (рис. 16) [113].

Клетки линии U2OS при эктопической экспрессии hTERC синтезируют и секретируют больше цитокинов по сравнению с клетками дикого типа в ответ на обработку TNF- α . Ингибирование экспрессии *hTERC* при помощи РНК-интерференции снижает уровень экспрессии и секреции цитокинов. Анализ взаимодействия TERC с хроматином демонстрирует, что большинство участков связывания расположены вблизи (± 1000 п.о.) положений начала транскрипции. Оказалось, что TERC взаимодействует с промоторами генов *LIN37*, *TPRG1L*, *TYROB* и *USP16*, которые вовлечены в активацию NF- κ B регуляторного каскада. Взаимодействие TERC с промоторами перечисленных генов, как и активация их экспрессии подтверждены экспериментально *in vitro*. Интересно, что экспрессия *hTERC* повышена в CD14⁺ клетках, полученных от пациентов с хроническим воспалением, страдающих диабетом II типа и рассеянным склерозом. Оказалось, что уровень экспрессии генов *TPGRL1*, *TYROBP*, *IL-8* и *TNF- α* повышен у больных диабетом, а *TYROBP*, *USP16*, *IL-6*, *IL-8*, *CSF2* и *TNF- α* -- у больных рассеянным склерозом, что позволяет предполагать, что теломеразная РНК человека участвует в регуляции воспаления (рис. 16) [115].

Взаимодействие TERC с регуляторными областями генов *CSF1* и *CSF2* [113], кодирующих факторы дифференцировки клеток крови, позволило предположить ее участие в гемопоэзе. Оказалось, что уровень экспрессии *CSF1* и *CSF3* снижен у мальков *Danio rerio* в условиях снижения содержания TERC, эктопическая экспрессия которой приводит к повышению количества обоих транскриптов. Ингибирование синтеза TERC приводит к снижению экспрессии генов транскрипционных факторов *sp1* и *gata1a*, регулирующих дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток. Оказалось, что TERC

регулирует экспрессию *gcsf* (granulocyte colony-stimulating factor) и *mcsf* (macrophage colony-stimulating factor) и поддерживает баланс экспрессии основных факторов транскрипции миелоидных (*spi1*) и эритроидных (*gata1*) клеток. Ингибирование экспрессии *TERC* в эмбрионах *D.rerio* приводит к развитию нейтропении и моноцитопении, которые характеризуются сниженным количеством полностью функциональных нейтрофилов и макрофагов. Этот эффект не зависит от активности теломеразы и длины теломер и полностью компенсируется эктопической экспрессией *TERC* [116].

1.3.3. Теломеразная РНК и защитные механизмы клетки

Участие теломеразной РНК в защитных механизмах клетки продемонстрировано в нескольких исследованиях. Киназа ATR (ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related) семейства PIKK участвует в регуляции клеточного ответа на повреждения ДНК. Появление одноцепочечных концов ДНК при процессинге двуцепочечных разрывов или при терминации репликативной вилки приводит к активации ATR [117,118]. Повышение экспрессии *hTERC* оказывает супрессирующее действие на активность ATR-киназы, а снижение количества теломеразной РНК стимулирует ATR-киназу независимо от активности теломеразы и длины теломер. Основными субстратами ATR-киназы в клетках являются белки: p53, онкосупрессор и один из основных регуляторов сигнальных путей ответа на стресс, и CHK1, регулятор клеточного цикла. Сниженное количество теломеразной РНК человека приводит к повышению уровня p53 и снижению количества CHK1. Предполагается, что *hTERC* ингибирует ATR-киназу и нарушает регуляцию клеточного ответа на повреждения ДНК (рис. 16) [119].

Активация киназы DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) происходит при репарации двуцепочечных разрывов ДНК по механизму негомологичного соединения концов [120,121] и зависит от количества *hTERC* в клетке [122]. DNA-PK относится к тому же семейству PIKK, что и ATR. Показано, что DNA-PK фосфорилирует hnRNPA1 в присутствии *hTERC* как *in vitro*, так и *in vivo*.

hnRNPA1 участвует в регуляции альтернативного сплайсинга. Ассоциация hnRNPA1 с теломеразой позволяет предполагать его участие в привлечении теломеразы к теломерам. Экзогенная экспрессия hTERC в клетках линии VA13, не поддерживающих экспрессию теломеразной РНК, приводит к увеличению количества фосфорилированной формы hnRNPA1, которое снижается в условиях обработки специфическим ингибитором DNA-PK [122].

Стимуляция пролиферации Т-лимфоцитов во время иммунного ответа ассоциирована с повышением экспрессии компонентов теломеразы [123–125]. Активация теломеразы приводит к повышению пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов и способствует их активному делению. Оказалось, что повышенный уровень экспрессии *hTERC* необходим для выживания CD4⁺ Т-клеток в коротких временных интервалах, тогда как активная теломераза – на долгих [126]. Повышенный уровень экспрессии гена теломеразной РНК оказывал защитное действие на клетки в условиях обработки дексаметазоном. Интересно, что теломеразная РНК дикого типа стимулировала теломеразную активность, но не защищала клетки от апоптоза, а экспрессия химерной РНК hTERC-U64, в которой 5'-часть соответствовала hTERC (псевдоузел и матричный участок), а 3'-часть (CR4/5 и H/ACA-бокс) была заменена на H/ACA-домен U64 мяоРНК, не активировала теломеразу и не защищала клетки от апоптоза. Эктопическая экспрессия мутантной формы теломеразной РНК (G305A), не способной формировать комплекс с hTERT, не активировала теломеразу, но защищала клетки от апоптоза. Снижение экспрессии *hTERT* при помощи РНК-интерференции приводит к повышению количества свободной теломеразной РНК и оказывает защитный эффект на клетки. Уменьшение количества теломеразной РНК стимулирует апоптоз в CD4⁺ Т-клетках. Активация экспрессии *hTERT* дикого типа, но не каталитически неактивной формы белка приводит к индукции апоптоза, а одновременная экспрессия каталитически неактивной формы теломеразной РНК способствует восстановлению устойчивости к апоптозу [126]. Эти данные

свидетельствуют о том, что теломеразная РНК человека защищает клетки в стрессовых условиях вне зависимости от активности теломеразы (рис. 16).

Участие теломеразной РНК человека в контроле функциональности митохондрий продемонстрировано недавно. Оказалось, что hTERC транспортируется в митохондрии, где подвергается процессингу рибонуклеазой RNASET2 с образованием укороченной до 195 н.о. (от 52 до 248 н.о.) формы (рис. 17). Укороченный продукт транспортируется в цитоплазму. Накопление процессированной формы в цитоплазме происходит при нарушении мембранного потенциала митохондрий в условиях обработки клеток FCCP или ротеноном [127].

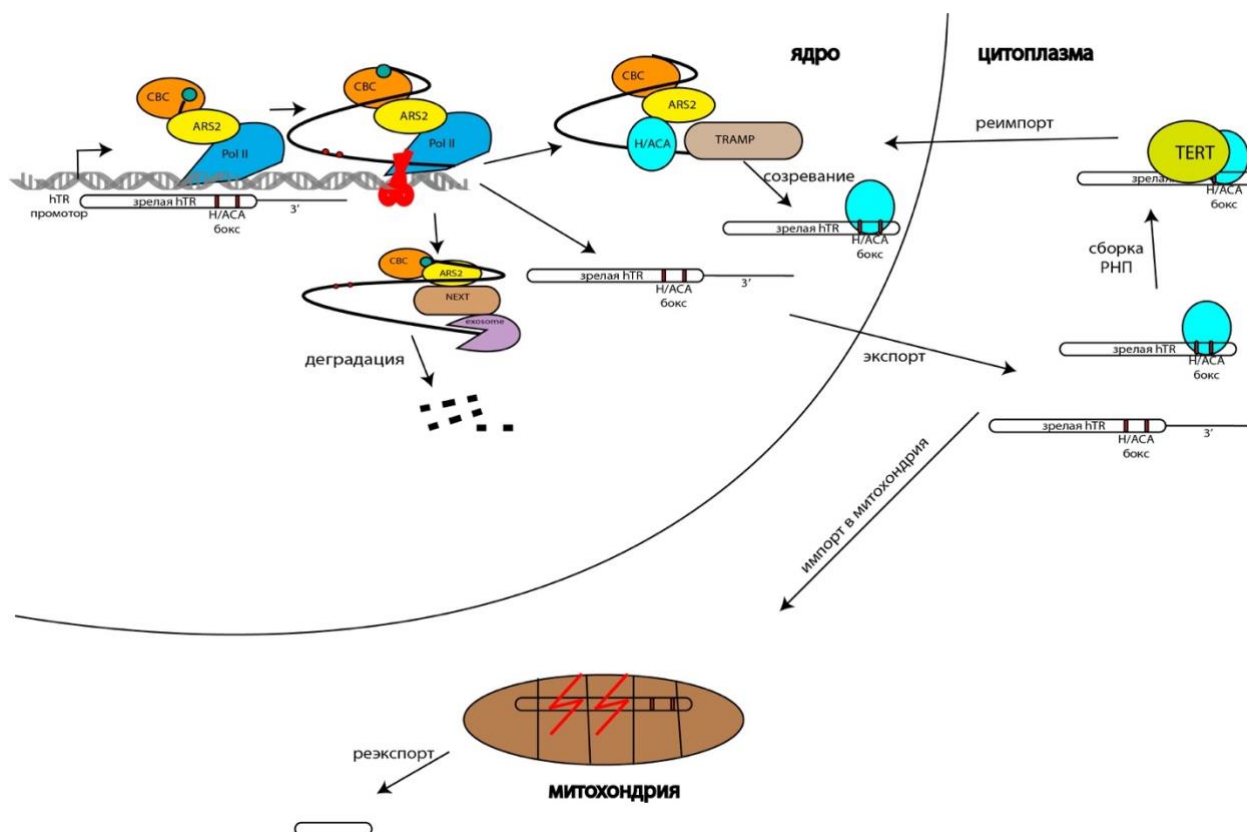


Рисунок 17. Схематичное изображение функционирования теломеразной РНК человека.

В некоторых организмах обнаружены дополнительные копии генов, кодирующих теломеразную РНК. В геноме мыши выявлена альтернативная теломеразная РНК (alTERC), последовательность которой на 87,9% идентична

последовательности mTERC дикого типа. В alTERC отсутствуют 18 н.о. в CR4 участке. Обнаружено, что *alTERC* экспрессируется в клетках мозга мыши, способна взаимодействовать с TERT и поддерживать активность теломеразы. Эктопическая экспрессия *alTERC* в большей степени чем *mTERC* дикого типа защищает моторные нейроны в условиях окислительного стресса. Оказываемый защитный эффект не зависит от экспрессии TERT и активности теломеразы [128].

Дополнительная копия TER обнаружена в геноме растений. TER1 и TER2 содержат участок длиной 220 н.о., степень идентичности которого составляет 90%. Обе формы могут взаимодействовать с TERT, но TER2 обладает большим сродством к каталитической субъединице теломеразы. Интересно, что только TER1 функционирует как матрица для синтеза теломер *in vivo*. Количество TER2 в клетках в нормальных условиях очень низко, но резко возрастает в условиях ответа на двуцепочечные повреждения ДНК, по-видимому, из-за стабилизации транскрипта [129,130].

Теломераза является перспективной мишенью для разработки подходов и средств терапии как онкологических заболеваний, так и заболеваний, связанных с преждевременным старением, регенерации тканей и увеличения продолжительности жизни. Для эффективной разработки терапевтических подходов и средств необходимо доскональное знание всех возможных аспектов функционирования предполагаемой мишени. Исследования теломеразы направлены не только на изучение состава, структуры и механизма работы активного комплекса, но и взаимодействия с субстратом – теломерой, сборки активного фермента, а также механизмов биогенеза компонентов теломеразного комплекса. Необходимо исследовать и альтернативные функции компонентов теломеразного комплекса, изучению которых уделяется недостаточно внимания ввиду их низкого содержания в клетке и сложности разделения эффектов, которые оказывает на клетки теломераза и ее компоненты по отдельности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Используемые реактивы и буферные растворы

В работе были использованы следующие реактивы и препараты:

- ♦ фенол, хлороформ, метанол, соляная кислота, ортофосфорная кислота фирмы Химмед, Россия;
- ♦ этиловый спирт фирмы Ферейн, Россия;
- ♦ $MgCl_2$, $NaCl$, NH_4OAc , KCl , Tris, $NaOH$, KOH , $(NH_4)_2S_2O_8$, $NaCl$, $NaOAc$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , EDTA, H_3BO_3 , HEPES, Tricine, тиосульфат натрия, персульфат аммония, бромфеноловый синий, ксиленцианол, бромистый этидий, имидазол, глицерин, ИПТГ, сахараза, Tween 20, акриламид, бакто-агар, легкоплавкая агароза для электрофореза, бычий сывороточный альбумин фирмы Helicon, Россия
- ♦ бромфеноловый синий, ксиленцианол, β -меркаптоэтанол, бромистый этидий, глицерин, Tween-20, акриламид, бис-акриламид, TEMED, бакто-агар, Кумасси R-250, легкоплавкая агароза для электрофореза, цитрат натрия фирмы Helicon, Россия;
- ♦ Triton X-100 фирмы Roth, Германия
- ♦ γ - ^{32}P АТФ фирмы Изотоп, Россия
- ♦ DTT, $MnCl_2$, EGTA, ампициллин, стрептомицин, пенициллин, хлорокин, CHAPS, формамид фирмы Sigma-Aldrich, Германия;
- ♦ бакто-триптон, дрожжевой экстракт, N,N'-метилен-бис-акриламид, PBS 1 таб/100мл, DMSO, BSA, PMSF, уксусная кислота, мочевины фирмы Amresco, США;
- ♦ T4 ДНК-лигаза, Taq-полимераза, эндонуклеазы рестрикции, ДНКазы I, T4 полинуклеотидкиназа, 25мМ раствор EDTA, 100 мМ раствор АТФ, 50% PEG 4000, 25 мМ раствор смеси дезоксирибонуклеотидов dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 25 мМ раствор $MgCl_2$, набор реагентов для приготовления кДНК для количественного ПЦР, питательная среда для роста клеток DMEM, питательная сыворотка FBS, ингибитор РНКаз Ribolock RI, набор реагентов для выделения РНК PureLink RNA mini

- kit, SYBR Green I, набор для трансфекции Lipofectamine RNAiMax, GlutaMax фирмы Thermo Fisher, США;
- ♦ Наборы реактивов для определения 5'- и 3'-концов кДНК (5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends и 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends) фирмы Invitrogen, США;
 - ♦ набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Mini, набор реагентов для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep, синтез олигодезоксирибонуклеотидов фирмы Евроген, Россия;
 - ♦ Наборы для выделения плазмидной ДНК: PureYield™ Plasmid Midiprep System" фирмы Promega, США; Plasmid Miniprep фирмы Евроген, Россия;
 - ♦ Набор для сайт-специфического мутагенеза QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit фирмы Stratagene, США
 - ♦ нитроцеллюлозная мембрана Hybond-N+ фирмы Amersham, Великобритания;
 - ♦ Хемилюминесцентный агент-субстрат для пероксидазы Amersham ECL reagents компании GE Healthcare Life Sciences);
 - ♦ Ni-NTA агароза, набор реагентов для ОТ-ПЦР фирмы Qiagen, Германия;
 - ♦ Набор для трансфекции кальций-фосфатным методом, Promega, США;
 - ♦ Таблетки PBS на 100 мл фирмы Amresco, США;
 - ♦ Среда LB фирмы Amresco, США;
 - ♦ Коктейль ингибиторов протеаз фирмы Roche, Швейцария;
 - ♦ Среда DMEM/F12, антибиотики PenStrep, 2,5% трипсин (10х), глутамин GlutaMax (100х), сыворотка эмбриональная бычья (FBS) фирмы Gibco, США;
 - ♦ Среда RPMI фирмы ПанЭко, Россия;
 - ♦ Доксорубин компании Лэнс Фарм (10 мг), Россия;
 - ♦ Хлорокин компании Sigma (C66288), США;
 - ♦ Полибрен компании Sigma (H9268), США;

- ♦ Первичные антитела: для иммуноблоттинга- anti-hTERP (1:250-1:1000 в 1.5% BSA в TBST; сток 0.014 мг/мл), anti-MAP LC3 alpha/beta (Santa Cruz Biotech (sc-398822), 1:1000), anti-SQSTM1/p62 (Abcam (ab56416), 1:1000), anti-H3_HRP (Abcam (ab21054), 1:5000), anti-GAPDH (Thermo Fisher Scientific (39-8600), 1:5000); для иммуноцитохимии- anti-hTERP (1:15 в 0.1% Tween 20 в PBS; сток 0.014 мг/мл), anti-MAP LC3 alpha/beta (Santa Cruz Biotech (sc-398822), 1:500), anti-SQSTM1/p62 (Abcam (ab56416), 1:100).
- ♦ Вторичные антитела: для иммуноблоттинга - goat anti-rabbit IgG _HRP (Invitrogen (G21234), 1:2500), goat anti-mouse IgG_HRP (Thermo Fisher Scientific (G21-040), 1:2000); для иммуноцитохимии- goat anti-rabbit IgG_ FITC (Invitrogen (A16097), 1:2400), goat anti-rabbit IgG_Alexa555 (Invitrogen (A21428), 1:2000), goat anti-mouse IgG_AlexaFluor488 (Thermo Fisher Scientific (A-11029), 1:2000)

Таблица 1. Растворы, используемые в работе

Название раствора	Состав раствора
среда LB (твердая среда LB)	1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl (+ 1.5% бакто-агар для твердой среды)
10х буферный раствор «Tango» (Thermo Scientific)	330 mM Tris-ацетат pH 7,9, 100 Mg(OAc) ₂ , 660 mM KOAc, 1 мг/мл БСА
10х буферный раствор для Taq-полимеразы (Thermo Scientific)	750 м M Tris-HCl pH 8.8, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Tween 20
10х буферный раствор для T4 ДНК-лигазы (Thermo Scientific)	400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM ДТТ, 5 mM ATP
10х буферный раствор для ДНКазы I (Thermo Scientific)	100 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ .
10х буферный раствор для T4 полинуклеотидкиназы (Thermo Scientific)	500 mM Tris-HCl pH 8.2, 100 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 1 mM спермидин
6х буферный раствор для нанесения ДНК на гель	0,1% ксиленцианол, 0,1 % бромфеноловый синий, 0,5% ДСН, 0,1 М ЭДТА pH 8.0, 50% глицерин

(Thermo Scientific)	
2x буферный раствор для нанесения РНК на гель (Thermo Scientific)	93% формамид, 0.1x TBE, 30 mM EDTA, 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленцианол
1xTBE	0,1 M Tris, 0,1 M H ₃ BO ₃ , 2 mM ЭДТА pH 8.3
1xPBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
TB	10mM HEPES, 55mM MnCl ₂ , 15mM CaCl ₂ , 250mM KCl
Питательная среда DMEM/F-12	DMEM/F-12, 10% FBS, 1x GlutaMax, 1x пенициллин-стрептомицин
Гибридизационный буфер для Нозерн-блоттинга (Church буфер)	0,5 M Na ₂ HPO ₄ -H ₃ PO ₄ буфер pH 7,2, 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M цитрат натрия pH 7,0
2x HBS	50 mM HEPES-KOH, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,12
PBST	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3, 0,05% Tween
TBST	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20
TRAP-буфер	20 mM HEPES-KOH pH 8,3, 1,5 mM MgCl ₂ , 63 mM KCl, 1mM EGTA, 0,1 мг/мл BSA, 0,005% v/v Tween-20
RSB	10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, pH 7,4
RSBG40	10 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 10% глицерин, Nonidet-P40, 0,5 mM DTT, pH 7,4

Таблица 2. Олигонуклеотиды, используемые в работе в качестве праймеров для ПЦР или для синтеза кДНК.

Название	5' – 3' последовательность	Специфичность/ применение в методике
hTR Fw	GTGGTGGCCATTTTTGTCTAAC	Зрелая форма hTR
hTR Rv	TGCTCTAGAATGAACGGTGGA	
3'hTR Fw	AGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	

3'hTR Rv	AGGTTTGGGGGTTCAACAAG	3'-удлиненный транскрипт hTR (452-539)
U2 Fw	CGCTTCTCGGCCTTTTGGC	Зрелая форма U2
U2 Rv	GTGCACCGTTCCTGGAGGT	
3'U2 Fw	AGGGAGGTGAGAGACGGTAG	3'-удлиненный транскрипт U2
3'U2 Rv	GTGGAAACGAAAGCGTGCC	
GAPDH Fw	TGCACCACCAACTGCTTAGC	мРНК GAPDH [131]
GAPDH Rv	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
pre-GAPDH	CCACCAACTGCTTAGCACC	пре-мРНК GAPDH [131]
pre-GAPDH	CTCCCCACCTTGAAAGGAAAT	
INTS1 Fw	GGACAAGAATTACATGGCCC	мРНК INTS1
INTS1 Rv	CTTTGGTTTGGGTGCCTCTG	
INTS9 Fw	CTCCTTGCTTACCACACACC	мРНК INTS9
INTS9 Rv	TGCAGAACTCTCCACCATTC	
INTS11 Fw	CCTACTTCAGCGAGATGGTGG	мРНК INTS11
INTS11 Rv	TCTGGGAGGTGAAGAAGTTGG	
sghTERC Fw	CACCGAAACAAAAAATGTCAGCTGC	гидовая РНК для редактирования гена <i>hTERC</i>
sghTERC Rv	AAACGCAGCTGACATTTTTTGTTC	
PSFFV-PhTR Fw	GGACGCATCCCACTGAGCC	клонирование hTR вместе с нативным промотором и 3'-областью
PSFFV Fw	GAATTCGGGTTGCGGAGGG	
hTR full Rv	GGGCCCCGGAACACACTTTCCAATG	
hTERCstU Fw	GTTCATTCTAGAGCAAACAAAAAATTTC AGCTGCTGGCCCGTTCGCCCC	Мутация в стартовом кодоне hTERP
hTERCstU Rv	GGGGCGAACGGGCCAGCAGCTGAAATT TTTTGTTTGCTCTAGAATGAAC	
hTERCstop Fw	GCGGCGGGTCGCCTGACCAGCCCCGA AC	Для внесения преждевременного стоп-кодона hTERP
hTERCstop Rv	GTTCGGGGGCTGGTCAGGCGACCCGCC GC	
РНК адаптер	pUCGUAUGCCGUCUUCUGCUUGidT	РНК-адаптер для 3'RACE

3'RACE Fw	AGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	Для первой стадии ПЦР 3'RACE
3'RACE Rv	CAAGCAGAAGACGGCATAACGA	
MID1_Fw	ACGAGTGCGTAGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	Для второй стадии ПЦР 3'RACE
MID1_Rv	ACGAGTGCGTCAAGCAGAAGACGGCATACGA	
MID3_Fw	AGACGCACTCAGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	
MID3_Rv	AGACGCACTCCAAGCAGAAGACGGCATACGA	
MID5_Fw	ATCAGACACGAGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	
MID5_Rv	ATCAGACACGCAAGCAGAAGACGGCATACGA	
MID7_Fw	CGTGTCTCTAAGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	
MID7_Rv	CGTGTCTCTACAAGCAGAAGACGGCATACGA	
MID9_Fw	TAGTATCAGCAGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	
MID9_Rv	TAGTATCAGCCAAGCAGAAGACGGCATACGA	
MID14_Fw	CGAGAGATACAGTTCGCTTTCCTGTTGGTG	
MID14_Rv	CGAGAGATACCAAGCAGAAGACGGCATACGA	
5'RACE кДНК	CCCACCAACAGGAAAGCGAAC	Для синтеза кДНК перед 5'RACE
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG	Для ПЦР 5'RACE
5'RACE Rv	GGCTGACAGAGCCCAACTCTT	
TS	AATCCGTCGAGCAGAGTT	Активность теломеразы TRAP [132]
ACX	GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAAC C	

Telg	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGT TTGGGTTAGTGT	анализ длины теломер [133]
Telc	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCC CTATCCCTAACA	

Таблица 3. Малые интерферирующие РНК и антисмысловые олигонуклеотиды, используемые в работе

Обозначение	Последовательность	Ген-мишень
si Luc	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTsdT	Люцифераза светлячка
Oligonucleotide#1	TAGGGTTAGACAA	42-54 hTERC
Oligonucleotide#2	GTTTGCTCTAGAATGAAC	153-170 hTERC
siRNA#1	GUCUAACCCUAAACUGAGAAAdTsdT	44-56 hTERC
siRNA#2	CGUUCAUUCUAGAGCAAACdTsdT	153-170 hTERC
siRNA#3	CGUCCUUCGAGAGCCAACdTsdT	153-170 hTERC
siRNA#4	CUGAGAAGGGCGUAGGCGCdTsdT	56-74 hTERC
siRNA#5	GAGUUGGGCUCUGUCAGCCdTsdT	303-321 hTERC
si INTS1	AAGAAACGACCUGAACUGUCAdTsdT	INTS1 [135]
si INTS9	GUGAACUCUGCCCUUAGUAdTsdT	INTS9 [136]
si INTS11	GCAAGAUCGCCGUAGACAAGAdTsdT	INTS11 [137]
#1-CR4/5	2'-OMe(3'-NH ₂ -GAUUGGGAUUGACUCUCCCC-5'- C3'-5'-UUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3')	hTERC
#2-CR4/5	2'-OMe (5'-UUGCUCUAGAAUGAACG-3'-C3-5'- GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ -3')	hTERC
C3-CR4/5	2'OMe-(5'-C3-GUUGCCCCGGGCCGACCGCG-NH ₂ - 3')	256-272 hTERC
C3#1	2'OMe-(5'-C3-CCCUUCUCAGUUAGGGUUAG- NH ₂ -3')	46-65 hTERC
C3#2	2'OMe-(5'-C3-UUGCUCUAGAAUGAACG -NH ₂ -3')	152-168 hTERC

Таблица 4. Олигонуклеотидные зонды для нозерн-блоттинга

Обозначение	5'-3'-последовательность	Мишень
N-hTR1	GACTCGCTCCGTTCTCTTC	Зонды для нозерн-блоттинга hTR [105]
N-hTR2	GCTCTAGAATGAACGGTGGAA	
N-hTR3	CCTGAAAGGCCTGAACCTC	
N-hTR4	CGCCTACGCCCTTCTCAGT	
N-hTR5	ATGTGTGAGCCGAGTCCTG	
N-GFP	ATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTAC TCCAGCTTGTGC	Зонд для нозерн-блоттинга GFP РНК [134]
N-7SL	GGAGGTCACCATATTGATGCCGAACCTTA GT	Зонд для нозерн-блоттинга 7SL РНК [81]

Все малые интерферирующие РНК и антисмысловые и «химерные» олигонуклеотиды синтезированы Тимофеем Зацепиным, лаборатория химии нуклеиновых кислот, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.2. Методы молекулярного клонирования

2.2.1. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Несколько колоний клеток переносили в колбу со 100 мл среды LB и растили при перемешивании 150 об/мин при 18°C до оптической плотности $A_{600} \sim 0,6$. После этого клетки охлаждали в течение 10 мин на льду и осаждали центрифугированием на 5000g в течение 10 мин при 4°C. Затем отбирали супернатант и ресуспендировали осадок клеток в 40 мл буфера ТВ. Охлаждали клетки во льду в течение 10 мин. Повторно центрифугировали, отбирали супернатант и ресуспендировали клетки в 8 мл буфера ТВ. Добавляли 560 мкл DMSO, тщательно перемешивали и инкубировали полученную суспензию 10 мин во льду. По 100 мкл полученных таким образом компетентных клеток переносили в пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C.

2.2.2. Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Пробирку с компетентными клетками размораживали во льду, добавляли 1-5 нг плазмидной ДНК, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали 30 мин во льду. Проводили тепловой шок в течение 30 сек при 42°C. Далее охлаждали пробирки во льду, добавляли 800 мкл LB и инкубировали 1 час в термостате при 37°C при интенсивном перемешивании.

Трансформированные плазмидой клетки высевали на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали чашку при 37°C в течение 16 ч.

2.2.3. Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реагентов для выделения плазмидной ДНК фирмы Fermentas согласно протоколу с использованием фирменных растворов.

Колонию клеток штамма JM109 *E. coli*, несущую определенную плазмиду, помещали в 5 мл среды LB с антибиотиком, и инкубировали при перемешивании в течение 16 ч на 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, 5 мин, ресуспендировали в 250 мкл Resuspension Solution (Fermentas), добавляли 250 мкл Lysis Solution (Fermentas), перемешивали, переворачивая пробирку, до образования вязкого прозрачного раствора. К полученному раствору добавляли 350 мкл Neutralization Solution (Fermentas), перемешивали, переворачивая пробирку, до появления белого хлопьевидного осадка. Осадок удаляли центрифугированием при 14000 об/мин в течение 5 мин, отбирали супернатант и пропускали его через специальную колонку для выделения ДНК, два раза промывали эту колонку 500 мкл Wash Solution, затем центрифугировали при 14000 об/мин для удаления следов этанола. Плазмидную ДНК элюировали с колонки 50 мкл Elution Buffer.

2.2.4. Выделение плазмидной ДНК для трансфекции эукариотических клеток

Выделение плазмидной ДНК для последующей трансфекции эукариотических клеток требует дополнительной очистки от эндотоксинов, совыделяющихся из клеток *E. coli*. Мы использовали для таких экспериментов набор реагентов PureYield™ Plasmid Midiprep System фирмы Promega. Плазмидную ДНК выделяли согласно протоколу с использованием фирменных растворов.

Колонию клеток штамма JM109 *E. coli*, трансформированную необходимой плазмидой, помещали в 50 мл среды LB с антибиотиком и инкубировали в термостате на 37°C при перемешивании в течение 16 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин, затем ресуспендировали в 3 мл Cell Resuspension Solution и добавляли 3 мл Cell Lysis Solution. Перемешивали полученную смесь переворачиванием пробирки, после чего инкубировали в течение 3 мин на комнатной температуре. Затем добавляли 5 мл Neutralization Solution и перемешивали, переворачивая пробирку, до появления белого хлопьевидного осадка. Взвесью центрифугировали при 15000 об/мин, 15 мин. Надосадочную жидкость отбирали и пропускали через очищающую колонку. Очищенный таким образом раствор плазмидной ДНК пропускали через связывающую колонку, которую затем промывали 5 мл Endotoxin Removal Wash и 20 мл Column Wash Solution. Плазмидную ДНК двукратно элюировали 400 мкл воды.

2.2.5. Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле

Для приготовления агарозного геля добавляли 0,8–1,0 г легкоплавкой агарозы к 100 мл раствора 1xTBE. Раствор прогревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы, не допуская кипения. Полученный раствор охлаждали до ~ 40–50°C, добавляли 5 мкл водного раствора бромистого этидия с концентрацией 10 мг/мл, перемешивали, выливали в плашку. После застывания геля вносили образцы в ячейки и проводили электрофорез.

2.2.6. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора реагентов для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля Gel DNA Recovery Kit фирмы Zymoclean согласно протоколу с использованием фирменных реагентов.

Из агарозного геля вырезали полоску, содержащую нужный фрагмент ДНК, взвешивали и помещали в пластиковую пробирку на 1,5 мл. Добавляли раствор ADB в отношении 3:1. Инкубировали пробирку при 40°C в течение 10-15 мин, перемешивая каждые 2-3 мин, до полного растворения агарозного геля. Переносили полученный раствор в специальную колонку для выделения ДНК и центрифугировали 30 сек при 14000 об/мин. Дважды промывали колонку 200 мкл Wash Solution. Затем элюировали ДНК 30 мкл Elution Buffer. Качество выделения определяли с помощью электрофореза в агарозном геле, концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop2000.

2.2.7. Создание генетических конструкций для получения модельных клеточных линий

Репортерные конструкции, используемые для получения стабильных клеточных линий, получены на основе лентивирусного вектора LeGO-iG2 [138].

Для создания репортерной конструкции PSFFV-PhTR проводили ПЦР-амплификацию геномной ДНК человека, используя праймеры PSFFV-PhTR Fw и hTR full Rv (Таблица 2). Для конструкции PSFFV проводили ПЦР с использованием праймеров PSFFV Fw и hTR full Rv (Таблица 2).

Вектор LeGO-iG2 и ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *Bsp120I* (*NotI* – в случае вектора). Полученную смесь разделяли при помощи электрофореза в агарозном геле при 100-150 мА. ДНК-фрагмент нужной длины вырезали и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля. Полученные фрагменты лигировали

при помощи ДНК-лигазы T4. В реакцию лигирования как правило брали 3х-кратный мольный избыток вставки. Полученные лигазные смеси трансформировали в компетентные клетки штамма JM109 *E. coli*.

Для создания конструкции PhTR мы обработали плазмиду PSSFV-PhTR рестриктазами *EcoRI* и *NheI*. Полученный вектор лигировали после обработки ДНК-полимеразой T4.

Для получения фрагмента, содержащего последовательность промотора CbH1 для конструкции PCbH1, использовали плазмиду pX458 [139]. Для этого плазмиду обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *AgeI*, затем процессировали концы ДНК-полимеразой T4. После инактивации ДНК-полимеразы T4 проводили обработку эндонуклеазой *XbaI*. Конструкцию PSFFV обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*, ДНК-полимеразой T4, а затем эндонуклеазой *NheI*. Далее оба полученных фрагмента лигировали.

Для векторной конструкции PU1 использовали плазмиду pBS-U1-hTR [52]. Плазмиду обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *SpeI*, ДНК-полимеразой T4, а затем эндонуклеазой *XbaI*. Полученный фрагмент лигировали с конструкцией PhTR, которую разрезали *EcoRI*, обрабатывали ДНК-полимеразой T4, и потом эндонуклеазой *XbaI*.

2.2.8. Создание конструкций, содержащих мутации в гене теломеразной РНК человека

Для получения мутаций в гене теломеразной РНК человека проводили сайт-специфический мутагенез с помощью набора реактивов QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit фирмы Stratagene.

Использовали пары праймеров hTERC stU и hTERC stop (Таблица 2) для внесения мутации в стартовый кодон, а также внесения преждевременного стоп-кодона. После проведения ПЦР добавляли 1мкл рестриктазы *DpnI* (10 ед/мкл) для удаления исходной метилированной двухцепочечной ДНК. Созданные плазмиды трансформировали в клетки *E.coli*. Первичный отбор правильных клонов после выделения плазмидной ДНК проводили при

помощи рестриктоного анализа, по результатам которого отобранные плазмиды секвенировали.

2.2.9. Создание конструкций для выключения экспрессии гена теломеразной РНК человека

В качестве вектора для вставки коротких РНК, образующих шпильки (shRNA), была выбрана плазида LeGO_C [138].

Вектор LeGO_C содержит ген mCherry флуоресцентного белка в качестве маркера.

Олигонуклеотиды, кодирующие шпилечную РНК (Таблица 3), гибридизовали и лигировали в вектор LeGO_C, предварительно обработанный эндонуклеазами рестрикции *HpaI* и *XhoI*.

2.2.10. Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов

Последовательность нуклеотидов полученных плазмид и ПЦР-продуктов проверяли при помощи автоматического секвенатора ABI prism 3100-Avant genetic Analyzer (4-х капиллярный) в Центре Коллективного Пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН).

2.3. Методы работы с культурами клеток эукариот

2.3.1. Культивирование клеток

Культуры эукариотических клеток растили в питательной среде, содержащей следующие компоненты:

среда DMEM/F12	450 мл
эмбриональная телячья сыворотка FBS	50 мл
раствор стрептомицина (5 мг/мл) с пенициллином (5000 ед/мл)	5 мл
L-глутамин	2 мМ

Выращивание клеток проводили в CO₂-инкубаторе (Sanyo) при 37°C и содержании CO₂ 5%. Клетки пересевали каждые 2-3 дня следующим образом:

- отбирали среду;
- промывали клетки 2 мл (на флакон 25 см²) раствора PBS;
- добавляли 1 мл (на флакон 25 см²) раствора трипсина с ЭДТА;
- инкубировали на 37°C в течение 5 минут;
- ресуспендировали клетки в 4 мл культуральной среды, переносили требуемый объем в новый культуральный флакон со свежей средой.

Количество клеток в объеме измеряли с помощью камеры Горяева или прибора Scepter Cell Counter (Merck). Все манипуляции проводили в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Растворы и культуральную среду предварительно прогревали до 37°C.

2.3.2. Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК из клеток HEK293T проводили с помощью набора реагентов для выделения геномной ДНК Quick-DNA™Miniprep Kit фирмы Zymoclean согласно протоколу с использованием фирменных реагентов.

После обработки раствором трипсин-ЭДТА клетки центрифугировали в течение 5 мин на 500 об/мин. Супернатант отбирали, к клеткам добавляли Genomic Lysis Buffer из расчёта 500 мкл буферного раствора на 5 млн клеток. Ресуспендировали клетки при помощи вортекса, взвесь затем переносили на колонку Zymo-Spin™ и центрифугировали 1 мин на 14000 об/мин. Последовательно промывали колонку 200 мкл DNA Pre-Wash Buffer и 500 мкл g-DNA Wash Buffer. Далее элюировали геномную ДНК 100 мкл Elution Buffer. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific).

2.3.3. Трансфекция клеток кальций-фосфатным методом

Трансфекцию плазмид лентивирусной системы третьего поколения мы проводили в клетки HEK293T методом кальций-фосфатной трансфекции.

Накануне трансфекции 5 млн клеток высевали в чашку Петри в среду

DMEM. На следующий день прогревали все рабочие растворы до комнатной температуры на водяной бане. В отдельной пробирке смешивали:

вирусный вектор со вставкой	15 мкг
плазмида gag/pol pMDLg/pRRE	10 мкг
плазмида Rev pRSV-Rev	5 мкг
плазмида Env phCMV-VSV-G	2 мкг
2M CaCl ₂	62,5 мкл
H ₂ O	до 500 мкл

Смесь CaCl₂/ДНК при постоянном перемешивании добавляли по каплям к равному объему 2хHEPES. Смесь инкубировали 10-20 минут при комнатной температуре. Отбирали старую среду от клеток и добавляли 10 мл свежей среды с 25мкМ хлорокина.

Смесь плазмид в кальций-фосфатном буфере добавляли по каплям к клеткам, помещали чашку Петри с клетками в CO₂–инкубатор. Спустя восемь часов меняли среду на DMEM без хлорокина, но с 20мМ HEPES-КОН (pH 7,3). Инкубировали 1 день. Эффективность временной трансфекции оценивали по свечению клеток при помощи флуоресцентного микроскопа Evos FL Imaging System, Thermo Fisher Scientific. Сбор вирусных частиц проводили через 24 и 48 часов. Для этого культуральную среду отбирали и фильтровали, используя PVDF-фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

2.3.4. Инфекция клеток вирусными частицами

Высевали 50000 клеток на лунку в 500 мкл среды в 24-луночную плашку, которую затем поместили в CO₂–инкубатор на 5 часов. После этого добавляли полибрен до конечной концентрации 8 мкг/мл и супернатант, содержащий вирусные частицы. Центрифугировали плашку в течение 1 часа при 1000g, 24 °C. На следующий день меняли среду на свежую без полибрена. На 4 день анализировали клетки с помощью флуоресцентного микроскопа. Сортировали клетки с помощью высокоскоростного клеточного сортера BD FACSAria III (Beckton Dickinson).

2.3.5. Сортировка клеток

Сортировку клеток осуществляли при помощи прибора BD FACSAria III (Beckton Dickinson). Для выделения популяции клеток использовали показатели прямого и бокового светорассеяния. В случае использования клеток эукариот их размер позволял выделить популяцию без дополнительных средств. При сортировке бактерий, а также обратных эмульсий, используемых в работах по изучению биоразнообразия микроорганизмов, применяли различные подходы к окрашиванию живых клеток. Экспрессия генов флуоресцентных белков, либо применение красителей, окрашивающих живые клетки (например, Calcein Violet), позволял достоверно выделить популяцию клеток малого размера. Применение флуоресцентных репортерных конструкций позволил разделять клетки по интенсивности сигнала, в случае исследования роли Интегратора в транскрипции теломеразной РНК человека, а также при изучении особенностей 5'-нетранслируемых областей бактерий. Различные популяции образовывались в результате чувствительности используемых репортеров к регуляторным событиям, происходящим в клетках.

В случае разработки подходов к терапии лимфомы при помощи CAR-T клеток проводили до 4 раундов отбора клеток, обработанных библиотеками лентивирусов.

2.3.6. Трансфекция клеток малыми интерферирующими РНК

Предварительно получали дуплексы малых интерферирующих РНК отжигом двух комплементарных одноцепочечных малых интерферирующих РНК в 50мМ ацетате натрия. Для этого разводили оцРНК в соотношении 1:1 до 10 пкмоль/мкл, нагревали до 80°C, инкубировали 5 минут при этой температуре, а затем оставляли остывать в выключенном термостате до комнатной температуры.

В день трансфекции клетки НЕК293Т высевали в 24-луночный планшет, по 80 тысяч клеток в лунку. После чего составляли смесь для трансфекции.

Составляли две смеси: среда Opti-MEM и Lipofectamine RNAiMAX, среда Opti-MEM и siRNA. Содержимое обеих пробирок объединяли и инкубировали 25 минут при комнатной температуре для формирования РНК-липидных комплексов. Далее меняли среду у клеток на Opti-MEM с 10% FBS, раствор комплексов добавляли в лунки с клетками, осторожно перемешивали и помещали в термостат на 37°C. На третий и пятый день инкубации меняли клеточную среду с малыми интерферирующими РНК на новую, приготовленную аналогичным образом, для проведения длительного нокдауна целевого гена. На шестой день из клеток выделяли РНК для дальнейшего анализа методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени.

Каждой малой интерферирующей РНК обрабатывали по три лунки клеток, таким образом, получая по три биологические реплики. Результаты обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени, впоследствии усредняли по всем трём репликам.

2.3.7. Трансфекция клеток при помощи электропорации

Трансфекцию плазмид в клетки VA13 проводили методом электропорации с помощью системы Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. $8-10 \times 10^6$ клеток промывали PBS и ресуспендировали в буфере R до $2,0 \times 10^7$ клеток/мл. Затем клетки смешивали с раствором ДНК (30 мкг) в буфере E2. Проводили электропорацию, используя наконечники объемом 100 мкл и следующие параметры: длительность импульса – 5 мс, импульсное напряжение – 1575 В, количество импульсов - 2. Клетки высевали в 6-луночный планшет и культивировали в течение 2 дней в среде DMEM/F12 без антибиотиков.

2.3.8. Иммунофлуоресцентная микроскопия

Клетки культуры, выращенные на покровных стеклах, фиксировали раствором 3-4% параформальдегида в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. Промывали стекла с клетками 4 раза буфером PBS.

Обрабатывали клетки 0,5% раствором Triton-X100 в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. Отмывали стекла с клетками от детергента в трех сменах буфера PBS по 5 минут в каждой. Затем инкубировали в 1% растворе BSA в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре для блокирования неспецифического связывания антител. К стеклам с клетками добавляли первичные антитела необходимого разведения в растворе 1% BSA в PBST. Инкубировали 1 час при комнатной температуре во влажной камере в темноте. Промывали 3 раза буфером PBS по 5 минут и инкубировали с раствором вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом. Инкубировали 1 час при комнатной температуре во влажной камере в темноте. Промывали 3 раза буфером PBS по 5 минут. Инкубировали клетки с 0,1-1 мкг/мл DAPI в течение 1 минуты, после чего промывали 3 раза буфером PBS в течение 5 минут. Помещали стекла (клетками вниз) на каплю среды заключения (Mowiol). Приготовленный препарат высушивали в течение 2-3 часов при комнатной температуре (в темном месте). Препарат анализировали, используя флуоресцентный микроскоп и конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Nikon C2.

2.3.9. Анализ выживаемости клеток

Апоптоз индуцировали доксорубицином. Примерно 10000 клеток высевали на лунку за день до добавления агента в 96-луночных планшетах. К культуральной среде добавляли доксорубицин, растворенный в ДМСО, до конечной концентрации от 0,1 до 12 мкМ. Клетки, обработанные ДМСО, использовали в качестве контроля. После 24 ч инкубации с препаратами к клеткам добавляли 100 мкл/лунку реагента МТТ и инкубировали в течение 3 ч. Затем отбирали среду и в каждую лунку добавляли 100 мкл ДМСО для растворения фиолетового осадка. После 1,5 ч инкубации планшки при перемешивании в темноте измеряли поглощение при 555 нм с помощью планшетного ридера Victor X5, Perkin Elmer. Все манипуляции с 96-луночными планшетами проводили на автоматизированной станции Janus

Extended, Perkin Elmer.

2.3.10. Ингибирование аутофагии

Клетки (3000/см²) высевали в лунки 6-луночных планшетов, после чего добавляли в культуральную среду хлорокин до конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали 6-24 часов.

2.4. Методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками

2.4.1. Выделение суммарной РНК, обработка ДНКазой и получение кДНК

Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора реагентов для выделения РНК PureLink RNA MiniKit согласно протоколу с использованием фирменных растворов. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью прибора Nanodrop 2000 Spectrophotometr фирмы Thermo Fisher Scientific.

Полученные образцы РНК (1 мкг) обрабатывали ферментом DNase I согласно протоколу с использованием фирменных растворов для удаления геномной ДНК. Обратную транскрипцию проводили с помощью фермента Maxima First Strand Kit cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR согласно протоколу с использованием фирменных растворов. Для контроля качества удаления геномной ДНК проводили реакцию без обратной транскриптазы.

2.4.2. ПЦР в реальном времени

ПЦР проводили на приборе CFX96™ Real-Time System с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager.

Использовали реагенты фирмы Thermo Scientific Fermentas: Taq ДНК-полимераза; буфер для Taq ДНК-полимеразы; раствор Mg²⁺ с концентрацией 25 мМ; смесь dNTP (дезоксирибонуклеозидтрифосфатов); интеркалирующий краситель SYBR Green. Все реагенты предварительно охлаждали во льду, все смеси также держали во льду до переноса в ПЦР-амплификатор. Для проведения ПЦР использовали следующие параметры: 95°C 3 мин; 35 циклов

денатурация -- 95°C 30 сек, отжиг праймеров -- 58°C 30 сек и элонгация -- 72°C 40 сек + измерение флуоресценции.

Для каждого образца ставили три одинаковые точки ПЦР; также отдельно ставили ПЦР с РНК, не обработанной обратной транскриптазой, и ПЦР с полным отсутствием матрицы для контроля чистоты реагентов.

Уровень экспрессии гена рассчитывали с помощью $\Delta\Delta C_t$ метода, используя нормировку на средний показатель по мРНК GAPDH. Результаты усредняли по трём одинаковым точкам для каждого образца, а затем по трём биологическим репликам.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и метода Шидака для множественных сравнений.

2.4.3. Нозерн-блоттинг

Из клеточных линий выделяли РНК. 30 мкг РНК упаривали в вакууме до объема примерно 15 мкл, добавляли 15 мкл краски дня нанесения РНК на гель, прогревали 5 мин при 75°C и наносили образцы на 4% денатурирующий полиакриламидный гель (акриламид:бис-акриламид 19:1) с 7М мочевиной.

Префорез проводили в течение 30 минут при 10 мА, затем наносили образцы, вгоняли в гель при 7 мА и далее проводили электрофорез при 10 мА до тех пор, пока краситель ксиленцианол не достигал нижней границы геля. После электрофореза гель окрашивали в течение 10 мин раствором бромистого этидия в 1х TBE и визуализировали при помощи камеры с УФ лампой.

Затем проводили полусухой перенос РНК из геля на мембрану Hybond™-N+ (GE Healthcare). Для этого собирали конструкцию из двух электродов, между которыми помещали фильтровальную бумагу, смоченную 1х TBE, гель и нитроцеллюлозную мембрану. Далее РНК переносили в течение 3,5 часов при силе тока 400 мА, периодически дополнительно смачивая фильтровальную бумагу 1х TBE. После переноса мембрану помещали в УФ-камеру на 5 минут при 1200x100 мкДж/см².

Мембрану с РНК предварительно вымачивали в Church буфере для гибридизации в течение 1 ч при 45°C. В это время ставили реакцию кинирования зондов для блоттинга (для hTR использовали смесь всех пяти зондов N-hTR1-N-hTR5 (Таблица 4) в эквивалентном соотношении; для GFP и для 7SL использовали по одному зонду (Таблица 4)). Олигонуклеотидные зонды очищали от непрореагировавшего радиоактивного АТФ при помощи колонок Micro Bio-Spin P-6 (Bio-Rad).

Далее меняли буфер для гибридизации мембраны на свежий, добавляли кинированные зонды и гибридизовали в течение 16-20 ч при 45°C. После мембрану отмывали при 50°C: однократно 2х SSC буфером с 0,1% SDS в течение 20 минут; двукратно 0,1х SSC буфером с 0,1% SDS в течение 20 минут. Мембрану оборачивали плёнкой SaranWrap и закладывали в кассету Storage Phosphor Screen BAS-IP MS 2025E (GE Healthcare) на 48ч для hTR-зондов и GFP-зонда и на 16ч для 7SL-зонда. Кассету затем проявляли на приборе TyphoonFLA 9500.

2.4.4. Определение 3'-границы транскрипта 3'-RACE

Используемая методика основана на описанной ранее в работе [82].

2 мкг суммарной клеточной РНК обработали ДНКазой и очистили при помощи набора реагентов для выделения РНК из раствора PureLink RNA MiniKit фирмы Ambion. Затем лигировали 100 пкмоль РНК-адаптера при помощи Т4 РНК-лигазы (Thermo Scientific Fermentas). Лигирование проводили в течение 18 часов на 16°C. Затем снова очистили РНК при помощи PureLink RNA MiniKit.

Полученную РНК использовали для синтеза кДНК, используя праймер, комплементарный РНК-адаптеру – 3'RACE Rv (Таблица 2) – и обратную транскриптазу Maxima RT. Далее последовательно проводили две стадии ПЦР. На первой стадии ПЦР-продукт получали с олигонуклеотидов 3'-RACE Fw и 3'-RACE Rv (Таблица 2).

Затем проводили вторую стадию ПЦР, для которой использовали олигонуклеотиды, содержащие так называемые «бар-коды» – короткие последовательности, отличающиеся для разных образцов. ПЦР проводили в объеме 50 мкл с использованием 2х PCR MasterMix. ПЦР-продукт анализировали в 1,5% агарозном геле. Для пиросеквенирования из геля выделяли участок с ампликонами длиной 100-400 п.н.. Длины ампликонов определяли при помощи GeneRuler Low Range DNA Ladder.

Секвенирование ПЦР-продуктов проводили на Roche Genome Sequencer (GS FLX) с использованием программного обеспечения от фирмы-производителя в лаборатории систем молекулярного клонирования Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Риды, не содержавшие в себе последовательность прямого праймера для ПЦР, комплементарного 3' области за пределами зрелой теломеразной РНК, из анализа исключили. Идентификацию данных, полученных в результате пиросеквенирования, проводили с использованием онлайн-ресурса BLASTN (NCBI).

2.4.5. Определение 5'-границы транскрипта 5'-RACE

Для 5'-RACE-анализа использовали набор реагентов 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen).

Вначале суммарную клеточную РНК обрабатывали ДНКазой I и синтезировали комплементарную ДНК в соответствии с протоколом от 5'RACE System. После этого удаляли исходную РНК: к каждому образцу добавляли 1 мкл смеси РНКаз и инкубировали 30 мин на 37°C. Для очистки кДНК от остатков РНК использовали S.N.A.P. колонки, входящие в состав набора 5'RACE System.

Далее удлиняли 3' конец кДНК при помощи терминальной трансферазы. Добавляли к образцам dCTP до концентрации 0,2мМ и 1 мкл терминальной трансферазы TdT. Инкубировали 10 минут на 37°C, затем инактивировали фермент прогреванием на 65°C в течение 10 минут. Также готовили

контрольные образцы, к которым вместо терминальной трансферазы добавляли 1мкл H₂O. Контрольные образцы в экспериментах обозначены как «-TdT».

Проводили ПЦР с праймерами AAP (Invitrogen) и 5'RACE Rv (Таблица 2). ПЦР-продукт анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Полученные ПЦР-продукты вырезали из геля, выделяли и секвенировали.

2.4.6. Приготовление клеточных экстрактов S100

Для получения экстракта использовали порцию 2x10⁸ клеток. Клетки собирали резиновым скребком и центрифугировали 10 минут 500 g на 4°C. Осадок клеток дважды промывали холодным буфером PBS, осаждая их после промывания центрифугированием в течение 3 минут 700 g при 4°C. Затем осадок промывали равным объемом 2,3х гипотонического буфера (1х гипотонический буфер: 10мМ HEPES pH 8.0, 3мМ KCl, 1мМ MgCl₂, 1мМ DTT, 10 ед/мл RNasin (Хеликон), коктейль ингибиторов протеаз (Roche), осаждали клетки центрифугированием в течение 5 минут при 700 g при 4°C и ресуспендировали в 0,75 их объема 2,3х гипотонического буфера. После инкубации во льду в течение 10 минут клетки переносили в холодный (0°C) 7-ми миллилитровый гомогенизатор Даунса и перетирали, используя пестик В (0°C). После дальнейшего 30-ти минутного выдерживания во льду образец центрифугировали 10 минут на центрифуге Eppendorf 5415R (Германия) при 10000 об/мин и 4°C. К осветленному экстракту добавляли 1/50 объема 5 M NaCl и проводили скоростное центрифугирование (100000 g при 4°C, центрифуга Beckman L8-50 M/E (США), ротор SW50.1, 1 час). К полученному препарату экстракта добавляли глицерин до конечной концентрации 20%, после чего экстракт порциями по 50-100 мкл замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Для приготовления экстракта использовали примерно 2x10⁸ клеток HeLa, конечный объем получаемого препарата экстракта составлял 1 мл, таким образом, можно считать, что 1 мкл препарата S100

представлял собой экстракт из 2×10^5 клеток. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Бредфорда, обычно она составляла 3-4 мг/мл.

2.4.7. Иммунопреципитация RPA

Поликлональные анти-RPA антитела из сыворотки иммунизированного кролика, очищенные с использованием аффинной хроматографии были любезно предоставлены к.б.н. П. П. Лактионовым (ИХБФМ). Экстракт S100 разбавляли PBS до концентрации белка ≈ 1 мг/мл. К 400 мкл разбавленного S100 экстракта добавляли антитела к RPA (5-10 мкл) и инкубировали смесь 1-2 часа при $+4^\circ\text{C}$ при перемешивании. 200 мкл протеин G-сефарозы преинкубировали 10 минут при $+4^\circ\text{C}$ с 50 мкл S100 экстракта и центрифугировали при 1000 g. Затем к протеин G-сефарозе приливали 400 мкл смеси экстракта и антител и инкубировали суспензию 1-2 часа при $+4^\circ\text{C}$ при перемешивании, после чего центрифугировали при 1000 g 5 минут. Супернатант собирали, делили на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Полученный препарат экстракта с пониженным содержанием RPA использовали для последующих экспериментов.

2.4.8. Разделение экстракта на ядерную и цитоплазматическую фракции

Использовали методику описанную в [131]. Использовали 5×10^6 клеток НЕК293Т. Клетки промывали трижды PBS и собирали при помощи скребка, центрифугировали и промывали PBS. Цитоплазматическую фракцию экстрагировали буфером RSBG40. Ядра промывали RSBG40 с добавлением 1/10 объема детергента (3,3% wt/wt дезоксихолата натрия и 6,6% v/v Tween 20). Осадок использовали в качестве ядерной фракции. РНК и белки из полученных фракций выделяли Тризолом, согласно инструкции производителя.

2.4.9. Белковый электрофорез в ПААГ-ДСН

Анализ белковых препаратов проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле (0,1% SDS).

Собирали камеру для заливки ПААГ-ДСН Mini-Protean II фирмы Bio-Rad, заливали 20% разделяющий гель, содержащий 375мМ Tris-HCl pH 8,8, 0,1% ДСН, 0,1% персульфат аммония, 0,05% ТЕМЕД, 20% смесь акриламида с N,N'-метиленбисакриламидом в соотношении 29:1. После полимеризации разделяющего геля заливали концентрирующий гель, содержащий 125мМ Tris-HCl pH 6,8, 0,1% ДСН, 0,1% персульфат аммония, 0,05% ТЕМЕД, 5% смесь акриламида с N,N'-метиленбисакриламидом в соотношении 29:1. В концентрирующий гель вставляли “гребенку” для образцов. После полимеризации концентрирующего геля наносили предварительно прогретые при 95°C в течение 5 мин образцы (к образцам предварительно добавляли 6х буфер для нанесения на гель или растворяли их в буфере NU). Электрофорез проводили в TGB сначала при 70 В, пока краситель не достигал границы концентрирующего и разделяющего гелей, затем - при 140 В, до прохождения бромфенолового синего до конца геля.

После проведения электрофореза гель помещали в ванночку с раствором для окрашивания белков (0,25% красителя Кумасси R-250, 45% этанола и 10% уксусной кислоты) и инкубировали 2–16 ч. Затем гель отмывали водой с уксусной кислотой до проявления белковых зон.

2.4.10. Вестерн-блоттинг

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле (18%) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Перенос белков из геля на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) проводили, используя прибор для полусухого переноса. Блокирование неспецифичных связываний осуществляли с помощью инкубации мембраны в 1,5% растворе бычьего сывороточного альбумина в течение ночи (+4 °C). Мембрану переносили в 20 мл буфера TBST и добавляли первичные антитела, разведенные до рабочей

концентрации. Инкубировали 1 час при перемешивании. Промывали мембрану три раза по 15 минут в буфере TBST. После этого добавляли к мембране в 20 мл буфера коммерческие вторичные антитела, связанные с пероксидазой хрена, в разведении, рекомендованном производителем. Инкубировали 1 час при перемешивании, затем промывали мембрану 3 раза по 15 минут в буфере TBST. Мембрану вынимали из отмывочного раствора и равномерно распределяли по ней хемилюминесцентный агент-субстрат для пероксидазы (Amersham ECL reagents, компания GE Healthcare Life Sciences). Для детекции люминесцентного сигнала использовали прибор ChemiDoc XRS System, компания Bio-Rad.

2.4.11. Определение активности теломеразы. TRAP-тест

TRAP-тест проводили как описано ранее [132] с некоторыми модификациями. На первом шаге готовили смесь N1: 49 мкл смеси TRAP, содержащей 1х TRAP-буфер (1х TRAP-буфер: 20 мМ HEPES-KOH pH 8.3, 1,5 мМ MgCl₂, 63 мМ KCl, 1мМ EGTA, 0,1 мг/мл BSA, 0,005% v/v Tween-20), 20 мкМ dNTP, за исключением dGTP, 4 мкМ dATP, 1,6 мкМ олигонуклеотида TS (Таблица 2) и экстракт клеток клеточных линий. Реакционную смесь инкубировали 30 минут при 30°C.

На втором шаге к смеси добавляли 2 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы (Хеликон), 0,1 мкг олигонуклеотида ACX (Таблица 2), 2мкКи [α -³²P]dGTP (3000 Ки/ммоль, Amersham) и проводили ПЦР по следующей схеме: 35 сек 94°C, 35 сек 50°C, 90 сек 72°C (30 циклов, амплификатор Mastercycler (Eppendorf, Германия)).

На третьем этапе к полученному после амплификации раствору смеси фрагментов ДНК добавляли дейонизированную воду до объема 100 мкл и последовательно экстрагировали 100 мкл фенола, насыщенного TE-буфером, повторяли экстракцию. Добавляли 10 мкл 3М NaOAc и 300 мкл 96% этанола. Смесь инкубировали 5 минут в жидком азоте или 30-60 минут при -20 °C и осаждали ДНК центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 минут.

Осадок ДНК промывали 100 мкл 80% раствора этанола, подсушивали на воздухе в течение 15-20 минут и растворяли в 16 мкл формамидной краски. Денатурировали ДНК выдерживанием 3-4 мин при 95°C с последующим охлаждением во льду. 8 мкл раствора наносили на полиакриламидный 10% гель (мочевина 7М, акриламид: BIS-акриламид 1:19 10%, TBE 1x, TEMED 0,1%, персульфат аммония 0,1%). В качестве электродного буфера использовали TBE 1x (0,1M Tris, 0,1M H₃BO₃, 2mM Na₂EDTA). Проводили электрофорез пока ксиленцианол не пройдет 15-20 см. Ксиленцианол на геле соответствует примерно второму повтору на рентгеновском снимке. Гель засушивали и фотографировали с помощью фосфоримиджера (Fuji).

Для определения активности теломеразы использовали и протокол амплификации теломерных повторов в реальном времени RQ-TRAP.

Эмпирическим путем было установлено, что наилучший результат дает реакция, эквивалентная 2000 клеток. Каждый образец разбавили 1x TRAP буфером до концентрации 400 клеток/мкл и анализировали в трех одинаковых реакциях, одновременно в этих же условиях анализировали образцы, в которых теломераза была инактивирована при 85°C в течение 10 мин. В качестве контроля контаминации использовали лизирующий буфер.

Готовили следующую реакционную смесь из расчета на одну 30 мкл реакцию: 1x TRAP буфер, 20 мкМ dNTP, 1,6 мкМ олигонуклеотида TS (Таблица 2) и экстракт клеток клеточных линий. Смесь инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Затем добавляли по 2,1 мкл смеси 2: 2 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 0,1 мкг олигонуклеотида ACX (Таблица 2), 0,06 мкл 100x SYBR Green I. Перемешали, центрифугировали 1 мин, перенесли в амплификатор для ПЦР в реальном времени BioRad CFX96/C1000 и проводили амплификацию при параметрах: 95°C 2 мин, далее 37 циклов 95°C 35 сек, 50 °C 35 сек, 72 °C 90 сек.

2.4.12. Анализ длины теломер

Для определения длины теломер использовали геномную ДНК, выделенную из клеточных линий. Проводили ПЦР в реальном времени, используя праймеры Telg и Telc (Таблица 2) [133] в присутствии SYBR Green I и следующие параметры: 15 мин 95°C; 2 цикла 15 сек 94°C, 15 сек 49°C; 32 цикла 15 сек 94°C, 10 сек 62°C, 15 сек 74°C детекция сигнала, 10 сек 84°C, 15 сек 88°C детекция сигнала контрольной матрицы. В качестве контрольной матрицы использовали ген *36B4*.

2.5. Анализ сборки теломеразы

2.5.1. Разделение экстрактов ультрацентрифугированием в градиенте концентраций сахарозы

10,5*10⁶ клеток каждой клеточной линии лизировали 500 мкл TRAP лизирующего буфера в течение 30 мин при 4°C на ротаторе, осадили клеточный дебрис при 16000g, 15 мин, 4°C и наслоили супернатант на градиент сахарозы, полученный растворением 20% сахарозы в 1x TRAP буфере с последующим двухкратным замораживанием-размораживанием 10 мл этого раствора в пробирке для ультрацентрифуги. После этого провели центрифугирование при 111132 g (30000 об/мин), 14 ч, 4°C, в роторе SW-41Ti в напольной центрифуге Beckman J2-HS фирмы Beckman Coulter. После центрифугирования раствор в пробирке разобрали на фракции по 500 мкл, осторожно отбирая сверху. Для анализа активности теломеразы считали, что концентрация клеток во фракциях составляет 1000 кл/мкл, поэтому их разбавляли до концентрации 400 кл/мкл и использовали в стандартной методике RQ-TRAP.

2.5.2. Выделение РНК

К 200 мкл каждой фракции добавили 600 мкл Тризола, перемешали, затем добавили 160 мкл хлороформа и центрифугировали при 12000g, 15 мин, 4°C. Затем в новую пробирку отобрали водную фазу и добавили к ней 400 мкл изопропанола. Пробирку инкубировали во льду 10 мин, затем осадили РНК

при 16000g, 15 мин, 4°C. После осаждения, РНК промыли 2 раза по 800 мкл ледяного 75% этанола, каждый раз центрифугируя при 16000g, 5 мин, 4°C. После промывок излишки спирта испарили в термостате при 40°C, а затем РНК растворили в 35 мкл воды. Полученный раствор РНК подвергали обратной транскрипции по стандартной методике и количественному ПЦР с использованием калибровочной кривой, построенной путем разбавления стандартного раствора hTR.

2.5.3. Подготовка стандартного раствора *in vitro* синтезированной hTR

Для расчета содержания hTR во фракциях готовили стандартный раствор hTR при помощи T7 транскрипции, затем из него готовили препарат кДНК и проводили количественный ПЦР. Матрицу для T7-транскрипции hTR получали при помощи ПЦР. Продукты ПЦР очистили с помощью набора Cleanup mini фирмы Евроген, и затем провели реакцию *in vitro* транскрипции с помощью набора MEGAScript-T7 Transcription Kit. РНК очистили при помощи набора PureLink RNA mini kit. Качество синтезированной РНК определяли, при помощи электрофореза в 4% поликариламидном геле в денатурирующих условиях. Получали кДНК. Для получения калибровочной кривой использовали последовательное двухкратное разбавление раствора кДНК с *in vitro* синтезированной hTR, считая концентрацию кДНК 100 пг/мкл.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа посвящена исследованию молекулярных механизмов функционирования теломеразы человека. Для выполнения основной функции теломеразы – удлинения теломер, необходимы два ее коровых компонента: теломеразная обратная транскриптаза и теломеразная РНК. Регуляция функционирования теломеразы многоступенчатый процесс, каждый этап которого вносит определенный вклад в работу фермента. Основными этапами регуляции работы теломеразы являются биогенез и сборка функционального фермента, а также его взаимодействие с субстратом – теломерой. Нарушения этих процессов, наблюдаемые при мутациях в компонентах теломеразы или теломер-ассоциированных белках, а также белках, участвующих в процессинге теломеразной РНК, приводят к развитию различного рода патологий, что позволяет предполагать потенциальную возможность управления работой теломеразы в терапевтических целях. Необходимо отметить, что дополнительные, не связанные с работой фермента, функции компонентов теломеразы, в частности теломеразной РНК, могут конкурировать в клетке, и смещение равновесия в сторону одной из функций также позволят регулировать работу фермента.

В настоящей работе мы исследовали несколько аспектов функционирования теломеразы: взаимодействие фермента с теломерами, сборку активного фермента, биогенез теломеразной РНК, а также ее альтернативную функцию.

3.1. Взаимодействие теломеразы с теломерами

3.1.1. Репликативный белок А модулирует взаимодействие теломеразы с теломерами

Одним из важных аспектов функционирования теломеразы является взаимодействие с теломерами. Удлинение теломер происходит в S-фазе клеточного цикла, когда теломераза встречается с ними в нуклеоплазме.

Теломерная ДНК, содержащая двуцепочечный и одноцепочечные участки, в ассоциации с мультисубъединичным белковым комплексом шелтерином образует сложные третичные структуры, такие как t- и D-петли и G-квадруплексы. Формирование третичных структур на конце теломер препятствует взаимодействию с ними теломеразы и является, ингибирующим фермент, фактором [7].

Репликативный белок А состоит из трех субъединиц: RPA70, RPA32 и RPA14 [140]. RPA участвует в клеточных процессах, связанных с метаболизмом ДНК: репликации, репарации и рекомбинации [141,142]. Домены типа “OB-fold”, входящие в состав RPA, определяют его взаимодействие с оцДНК [17,143]. RPA может образовывать комплексы с ДНК нескольких типов в зависимости от конформации белка. При образовании комплексов первого типа белок принимает вытянутую конформацию и с высоким сродством (до 0,1 нМ) связывает участок ДНК длиной 30 н.о. [140,141]. Связывание оцДНК длиной 8-10 н.о. глобулярной формой RPA характеризуется кооперативностью [140,141]. Промежуточная конформация гетеротримера взаимодействует с ДНК длиной 13-22 н.о. [143]. RPA предпочитает последовательности ДНК, обогащенные пиримидиновыми основаниями, и эффективно взаимодействует с неканоническими структурами ДНК, например, G-квадруплексами, которые склонны образовывать теломеры [18]. На момент исследования нами роли RPA в регуляции функционирования теломеразы в литературе появлялись первые публикации, демонстрирующие участие RPA в удлинении теломер. Было известно, что в дрожжах *S. cerevisiae* RPA взаимодействует с белками, связанными с теломеразой, и могут способствовать ассоциации фермента с субстратом [17], а в дрожжах *Shizosaccharomyces pombe* RPA принимает участие в поддержании стабильности теломер [144]. Была показана колокализация RPA с теломерами в клетках трипаносомы *Leishmania* [145]. Активность теломеразы *Thermus thermophila* в системе *in vitro* снижается в присутствии RPA [146]. На момент исследования нами влияния RPA на активность теломеразы человека было

показано взаимодействие RPA человека с теломерной ДНК, которое способствовало разрушению, образованных ею G-квадруплексов *in vitro* [18].

Мы предположили, что RPA, связываясь с оцДНК теломерных участков, должен модулировать активность теломеразы. Имея сродство к оцДНК, RPA может вытеснять белки шелтеринового комплекса, освобождая 3'-конец теломер и способствуя связыванию теломеразы. Кооперативность взаимодействия RPA с оцДНК при повышении концентрации белка должна приводить к защите теломерного одноцепочечного участка и блокировке связывания теломеразы (рис. 18).

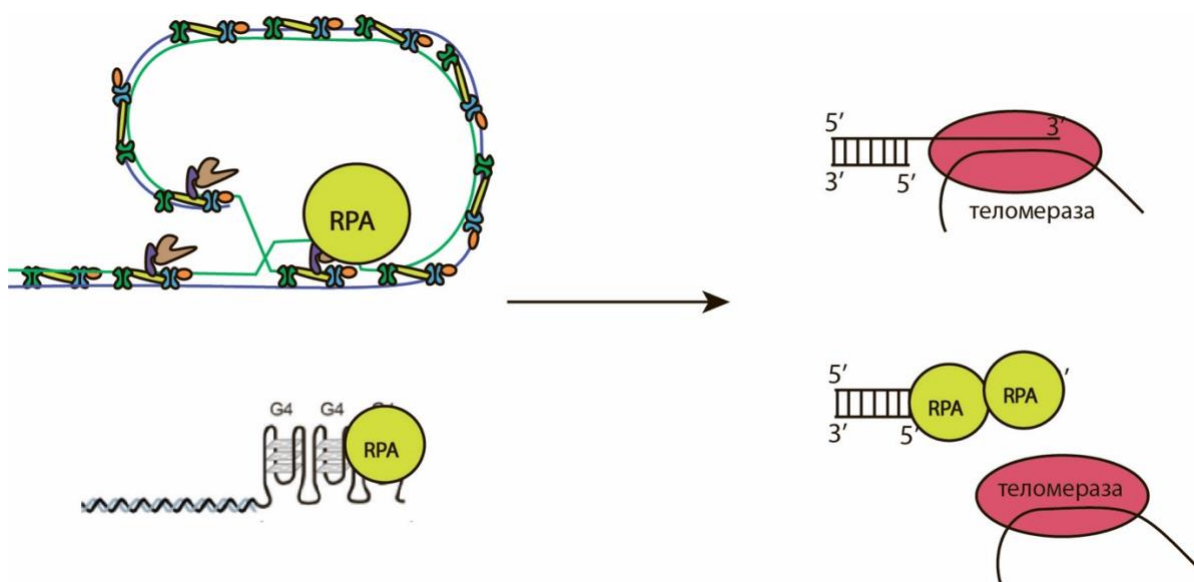


Рисунок 18. Предполагаемая модель модуляции активности теломеразы репликативным белком А.

Для проверки гипотезы о влиянии RPA на функционирование теломеразы мы воспользовались методом TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol), который позволяет определять теломеразную активность в экстракте клеток (рис. 19). Для этого используют теломер-подобный праймер, который удлиняется теломеразой клеточного экстракта. Низкое содержание теломеразы в клетках затрудняет проводить прямую детекцию синтезированного теломеразой продукта, что заставляет исследователя вводить дополнительный этап ПЦР-амплификации. В ходе

работы была проведена оптимизация метода TRAP, который является чувствительным ко многим параметрам реакции [147]. Отработка и оптимизация метода TRAP была осуществлена в рамках работ, посвященных разработке диагностикума опухолей шейки матки. Эта работа была проведена в сотрудничестве с РОНЦ имени Н.Н. Блохина и позволила продемонстрировать предсказательный потенциал определения теломеразной активности в образцах биопсий предопухолевых поражений шейки матки [148].

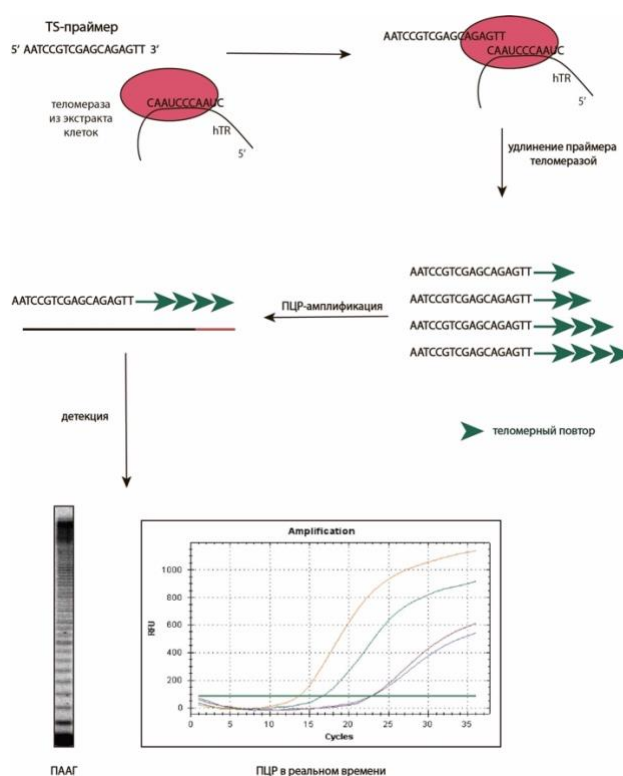


Рисунок 19. Схема, иллюстрирующая принцип метода TRAP.

Клетки линии HeLa использовали для получения S100 экстракта. Полученный экстракт инкубировали с поликлональными антителами кролика против RPA. Комплексы антител с целевым белком иммунопреципитировали, используя белок G сефарозу. Степень удаления RPA из экстракта клеток оценивали при помощи Вестерн-блоттинга. Согласно данным, приведенным на рисунке 20, RPA был удален из экстрактов практически полностью.

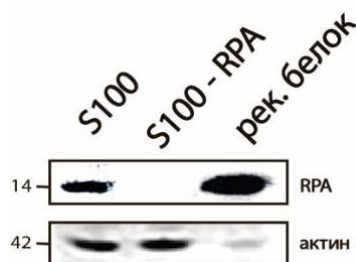


Рисунок 20. Анализ S100 экстракта клеток HeLa до и после иммунопреципитации RPA методом Вестерн-блоттинга.

На верхней панели представлен анализ содержания RPA в экстрактах до иммунопреципитации RPA (S100) и после (S100-RPA). В качестве контроля использовали рекомбинантный белок (рек. белок).

На нижней панели приведены данные о содержании актина в экстрактах клеток до иммунопреципитации RPA (S100) и после (S100-RPA). В качестве контроля использовали коммерческий препарат актина (рек. белок).

Полученные экстракты клеток HeLa дикого типа и обедненный по RPA, мы использовали для измерения теломеразной активности методом TRAP с последующим разделением продуктов реакции в полиакриламидном геле. Использовали разное количество экстракта, к которому в каждом случае добавляли одинаковое количество теломер-подобного праймера. Количество используемого экстракта в конкретной реакции определяли числом клеток, из которого он был получен. Проведенный таким образом анализ изменения активности теломеразы выявил значимое ингибирование фермента в случае отсутствия в экстракте RPA. Активность теломеразы значительно снижена в экстрактах после иммунопреципитации RPA. Согласно нашим данным теломеразная активность сравнима в цельных экстрактах из 50 клеток и в экстрактах без RPA из 200 клеток (рис. 21A). Необходимо отметить, что в цельных экстрактах активность теломеразы наблюдается, начиная с 10 клеток, постепенно нарастает до 50 клеток, после чего происходит ингибирование работы фермента. В случае использования экстрактов после иммунопреципитации RPA мы наблюдали появление активности в 200

клетках, а дальнейшее увеличение количества экстракта приводило к ингибированию работы фермента (Рис. 21А).

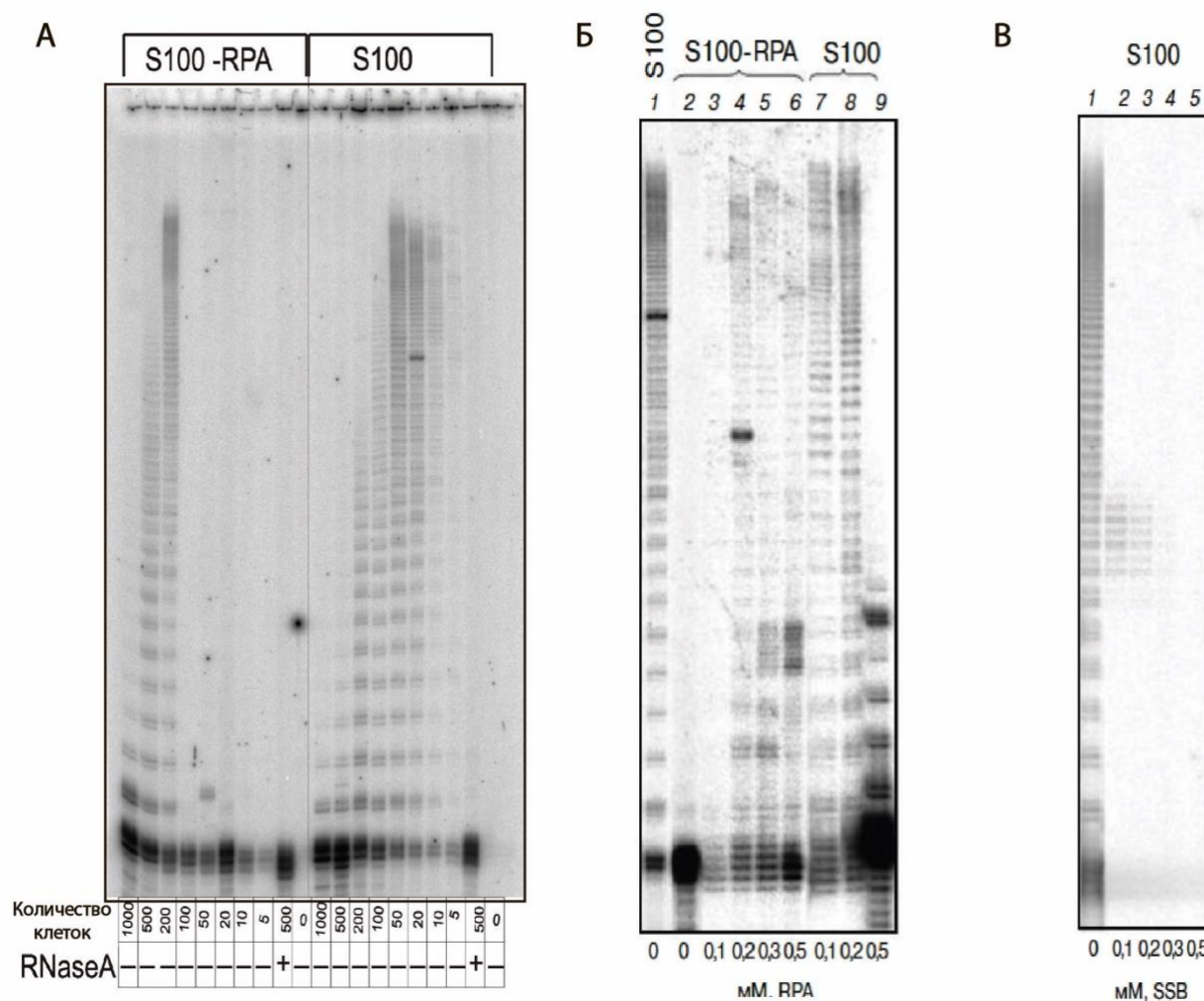


Рисунок 21. Влияние RPA на активность теломеразы.

А. Анализ теломеразной активности при помощи метода TRAP в S100 экстрактах клеток HeLa до и после иммунопреципитации RPA. В реакцию брали экстракт из определенного количества клеток. Обработка клеток RNaseA позволяет контролировать специфичность реакции.

Б. Анализ теломеразной активности при помощи метода TRAP в S100 экстрактах клеток HeLa до и после иммунопреципитации RPA при добавлении рекомбинантного препарата RPA.

В. Анализ теломеразной активности при помощи метода TRAP в S100 экстрактах клеток HeLa при добавлении SSB.

В ходе иммунопреципитации может происходить совыделение компонентов клетки, образующих комплексы с целевым белком, антитела против которого были использованы в опыте. Чтобы исключить инактивацию теломеразы или удаления других белков-регуляторов активности фермента, мы оценили способность рекомбинантного RPA человека восстанавливать активность теломеразы при добавлении в экстракт. Добавляли разные количества рекомбинантного RPA в обедненный RPA экстракт из 20 клеток, в котором отсутствует активность теломеразы. Появление теломеразной активности детектировали при добавлении RPA в концентрации от 0,2 мМ. Восстановление теломеразной активности происходит в процессивной манере, что характеризуется появлением длинных продуктов реакции (рис. 21Б), а повышение концентрации RPA приводит к снижению процессивности фермента, о чем свидетельствует перераспределение продуктов реакции в более короткую фракцию. Интересно, что добавление рекомбинантного RPA к исходному цельному S100 экстракту приводит к стимуляции процессивности теломеразы, а при дальнейшем увеличении количества RPA в экстракте происходит ингибирование активности фермента (рис. 21Б) [149].

RPA взаимодействует с оцДНК, проявляя слабое предпочтение последовательностям богатым пиримидиновыми основаниями, поэтому его влияние на теломеразную активность может быть неспецифичным, и любой белок, обладающий сродством к оцДНК, способен в экстракте проявить схожую активность. Мы добавляли белок SSB (single strand binding) *E.coli* в S100 экстракт в тех же количествах, что и RPA и оценивали влияние на теломеразную активность. Белок SSB взаимодействует с оцДНК и участвует в процессах репликации, репарации и других подобно RPA. Мы обнаружили полное подавление активности теломеразы при добавлении SSB в S100 экстракт из 20 клеток. Добавление небольших количеств SSB к экстракту из 50 клеток существенно изменял спектр длин образуемых продуктов, а избыток SSB полностью ингибировал теломеразную активность (рис. 21В).

Полученные нами данные позволяют заключить, что RPA специфически взаимодействует с теломерными последовательностями ДНК и модулирует способность теломеразы удлинять субстрат -- 3'-выступающий конец теломеры.

Наше исследование роли RPA в регуляции активности теломеразы было опубликовано в 2009 году и оказалось первой публикацией, определившей модулирующую активность RPA в отношении теломеразы человека. В последнее десятилетие исследования влияния RPA на функционирование теломеразы и теломер продолжались. Опубликованные за это время данные позволяют предложить модель, иллюстрирующую регуляторную роль RPA в поддержании длины теломер (рис. 22).

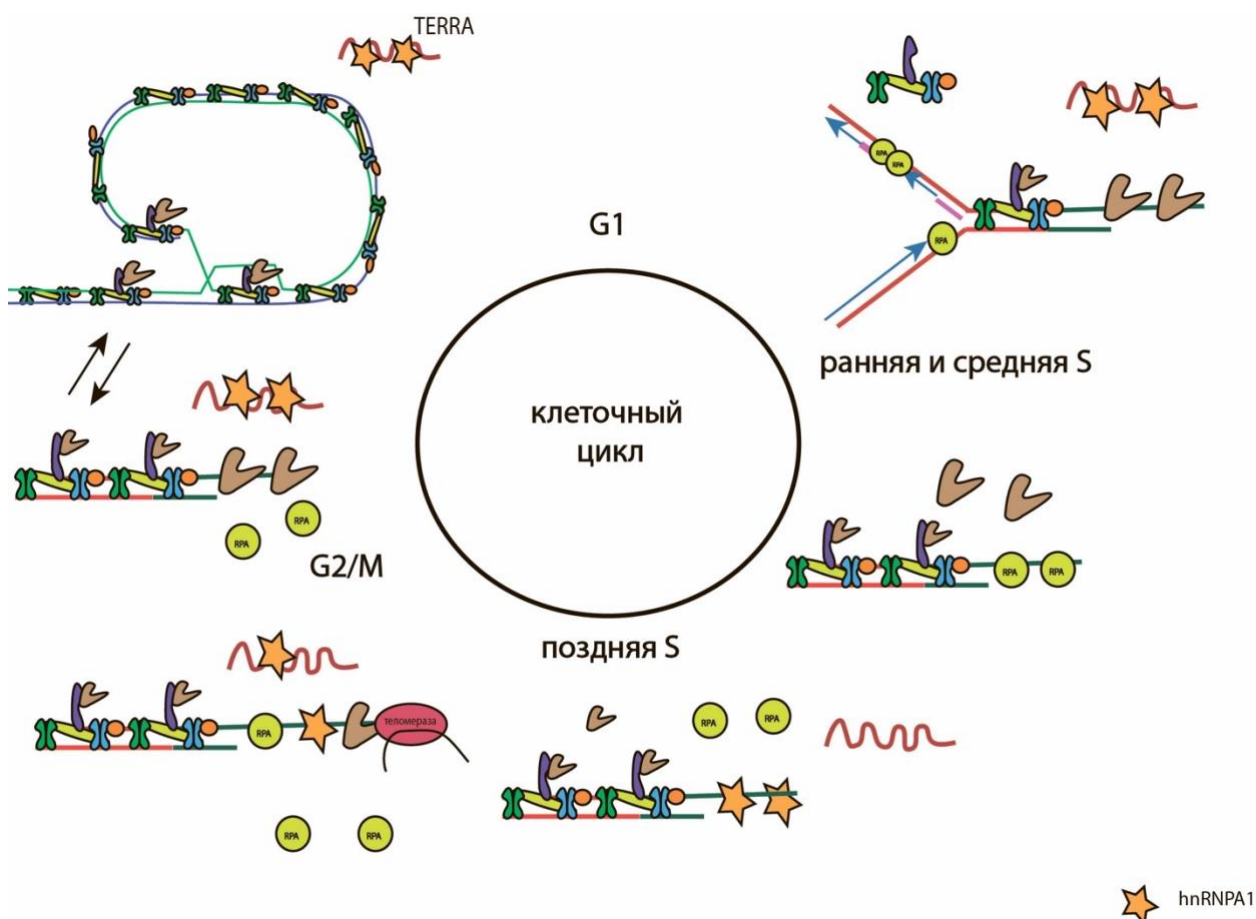


Рисунок 22. Схематичное изображение изменений теломерного хроматина в ходе клеточного цикла. Рисунок адаптирован из [151].

Основной мишенью связывания RPA в клетке являются одноцепочечные участки ДНК, появляющиеся в ходе образования репликативных вилок. Удлинение теломер происходит в конце S-фазы клеточного цикла, когда репликация ДНК практически завершена. Освободившийся RPA взаимодействует с теломерными последовательностями, что может способствовать расплетанию G-квартетных структур, вытеснению теломерных белков и облегчению взаимодействия теломеразы с субстратом. Кооперативное связывание RPA с ДНК приводит к блокировке теломерных участков, что препятствует эффективному синтезу теломер, снижая процессивность и ингибируя теломеразу [149].

Белок POT1 является регулятором доступности теломер для удлинения теломеразой [150]. POT1 взаимодействует с G-богатым выступающим одноцепочечным участком теломер, защищая ДНК от деградации и процессов рекомбинации. Взаимодействие POT1 с теломерой стимулирует активность теломеразы по одним данным или блокирует взаимодействие фермента с субстратом, согласно другим данным. Сродство POT1 и RPA к оцДНК позволяет предполагать, что эти белки конкурируют за 3'-выступающий конец теломер. Обнаружено, что hnRNPA1 взаимодействует как с теломерой, так и с TERRA. В ходе репликации, формирующиеся репликативные вилки меняют структуру ДНК, в том числе и в теломерных областях. В ранней и средней S-фазе RPA вытесняет POT1 из теломерных областей. При переходе клетки в позднюю S-фазу белки RPA, POT1 и hnRNPA1 конкурируют за связывание с теломерами и POT1 способен привлечь активную теломеразу. В дальнейшем теломеры формируют структуру t-петли (рис. 22) [151].

3.2. Биогенез теломеразы – потенциальный объект для разработки терапевтических подходов

Взаимодействие теломеразы с теломерой – один из этапов функционирования фермента, воздействие на который позволяет регулировать активность фермента. Биогенез теломеразного комплекса

является многостадийным процессом, в котором каждый этап можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для направленного воздействия в целях регуляции активности фермента. Ингибирование полимеразной активности теломеразы ввиду сходства ее каталитического центра с другими клеточными полимеразами приводит к многочисленным побочным эффектам. Блокирование матричного участка теломеразной РНК с помощью антисмысловых олигонуклеотидов оказывается неэффективным, потому что теломерная ДНК, а также TERRA предоставляют множество участков взаимодействия. Множество неспецифических участков связывания приводит к увеличению количества олигонуклеотида, необходимого для эффективного ингибирования целевой мишени, что увеличивает риск побочных эффектов, а также повышает стоимость такого подхода. Воздействие на биогенез теломеразного комплекса представляется наиболее перспективным в аспекте разработки новых терапевтических подходов в области онкологии, а также регенерации тканей и продления жизни. В настоящей работе мы сосредоточились на исследовании возможности использования теломеразной РНК человека в качестве мишени для разработки подходов к регуляции функционирования теломеразного комплекса. В качестве потенциальных мишеней были выбраны различные аспекты функционирования теломеразной РНК: блокирование антисмысловыми олигонуклеотидами структурных элементов, потенциально-важных для сборки активного фермента, транскрипция и процессинг теломеразной РНК, а также альтернативные функции этой молекулы в клетке.

3.2.1. Ингибирование сборки теломеразы человека с помощью блокирования структурных элементов теломеразной РНК

Известно, что компоненты теломеразы осуществляют дополнительные, не связанные с удлинением теломер функции, нарушение которых может непредсказуемо сказываться на состоянии клеток. Ингибирование активности теломеразы за счет блокирования сборки теломеразного комплекса не должно

влиять на уровень компонентов фермента в клетке, что делает разработку подходов, основанных на ингибировании этой стадии биогенеза фермента, перспективными для дальнейшего внедрения в практику.

В структуре теломеразной РНК человека выделяют несколько доменов, участвующих в образовании комплекса с теломеразной обратной транскриптазой. В процессе формирования комплекса происходит взаимодействие TERT с псевдоузлом и доменом CR4/5 теломеразной РНК человека [44]. Отдельно взятые молекулы РНК, соответствующие псевдоузлу и домену CR4/5 теломеразной РНК, в комплексе с TERT способны частично реконструировать активный фермент. Мутации, нарушающие образование шпильки Р6.1 домена CR4/5 приводят к нарушению взаимодействия hTERT с hTR, а также снижению теломеразной активности [45,48]. Мы предположили, что взаимодействие антисмысловых олигонуклеотидов с элементами третичной структуры теломеразной РНК, вовлеченными в образование теломеразного комплекса, приведет к ингибированию сборки теломеразного комплекса. Для проверки гипотезы необходимо было определить структурные элементы теломеразной РНК, доступные для взаимодействия с антисмысловыми олигонуклеотидами. На основании данных о способности псевдоузла формировать альтернативную вторичную структуру, состоящую из двух шпилек [152], а также данных об открытых доменах теломеразной РНК, полученных при помощи химического пробинга *in vivo* и *in vitro* [153], мы выбрали несколько положений в молекуле теломеразной РНК в качестве мишеней для ингибирования сборки теломеразы (рис. 23, Таблица 3). Для выбора наиболее оптимальных положений для блокировки олигонуклеотидами оценивали ингибирование экспрессии теломеразной РНК, а также теломеразной активности и длину теломер. Мы сравнили несколько подходов ингибирования при помощи коротких нуклеиновых кислот: РНК-интерференция при помощи siRNA или shRNA, а также антисмысловые ДНК-олигонуклеотиды (Таблица 3).

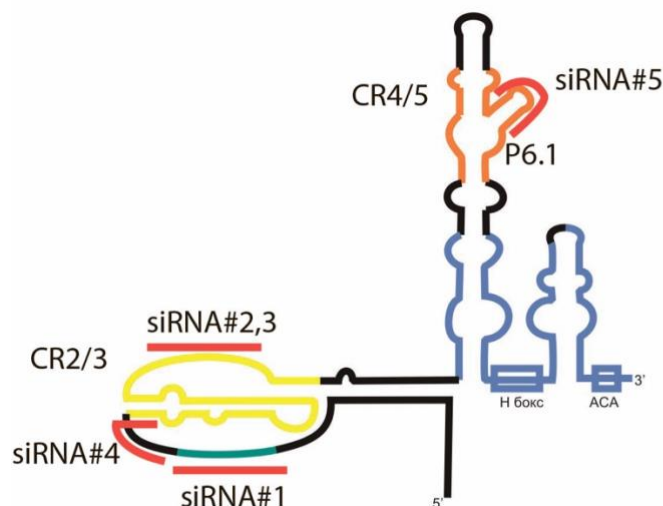


Рисунок 23. Схематичное изображение вторичной структуры теломеразной РНК человека. Красными линиями обозначены участки взаимодействия siRNA, shRNA и антисмысловых олигонуклеотидов, использованных в работе.

Мы использовали siRNA комплементарную матричному участку теломеразной РНК человека в качестве положительного контроля [154] и siRNA комплементарную последовательности люциферазы светлячка в качестве контроля неспецифического влияния (Таблица 2). Клетки линии HEK293T трансфецировали синтезированными siRNA и через 48 часов оценивали изменение уровня экспрессии hTERC при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество теломеразной РНК в клетках нормировали на количество РНК генов *GAPDH* и U2 мяРНК и количество теломеразной РНК в клетках трансфецированных siRNA комплементарной мРНК люциферазы светлячка. Оказалось, что siRNA#1 комплементарная матричному участку теломеразной РНК человека снижает уровень экспрессии *hTERC* на 30%, а siRNA#2 комплементарная участку J2a/3 домена CR2/3 псевдоузла – на 40% (рис. 24A). Все остальные использованные siRNA не влияли на количество теломеразной РНК в клетках. Снижение количества теломеразной РНК, наблюдаемое нами при использовании РНК-интерференции, может быть недостаточным для эффективного ингибирования теломеразы, поэтому мы решили оценить

изменение длины теломер в клетках в условиях длительного нокдауна гена *hTERC*. Для этого последовательности siRNA#1, 2 и 3, а также контрольной комплементарной мРНК люциферазы светлячка были клонированы в вектор LeGo-C или LeGo-Cer [138] для экспрессии короткой шпилечной РНК (shRNA), процессируемой в клетке с образованием микроРНК. Клетки с экспрессией пустого вектора использовали в качестве контроля. Были получены стабильные клеточные линии при помощи трансдукции вирусными частицами, несущими полученные конструкции. Выбранные нами вектора серии LeGo кодируют флуоресцентные белки, позволяющие обогатить культуру позитивной фракцией клеток после трансдукции. Мы использовали высокоскоростной клеточный сортер для отбора клеток, синтезирующих флуоресцентный белок, в геном которых интегрировала кассета для экспрессии shRNA и маркерный белок. Разработанные подходы к сортировке клеток позволили провести исследования в различных областях молекулярной биологии. Удалось изучить зависимость эффективности трансляции от структуры 5'-нетранслируемой области [155], разработать платформу для анализа биологического разнообразия и микробиологических сообществ [156,157], а также подходы к поиску лигандов для персонализированной терапии с использованием CAR-T клеток [158].

Анализ количества теломеразной РНК и длины теломер проводили через 75 удвоений популяции после получения фракции, обогащенной целевыми клетками на 90-95%. Количество теломеразной РНК определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Данные нормировали на количество РНК генов *GAPDH* и U2 мРНК. Длину теломер определяли при помощи ПЦР в реальном времени [133]. Оказалось, что количество теломеразной РНК снижалось на 60-70% в случае использования shRNA#1 и 2 (рис. 24Б). Экспрессия shRNA#3, несмотря на частичную комплементарность последовательности, приводила к снижению количества теломеразной РНК в клетках на 50%. Частичная комплементарность микроРНК не позволяет комплексу RISC деградировать целевую РНК.

Однако, в случае теломеразной РНК взаимодействие с мишенью должно приводить к ингибированию сборки активной теломеразы. Известно, что свободная hTERC подвергается деградации в клетке [60]. Мы предполагаем, что в данном случае фракция теломеразной РНК человека, не взаимодействующая с hTERT, подвергается деградации.

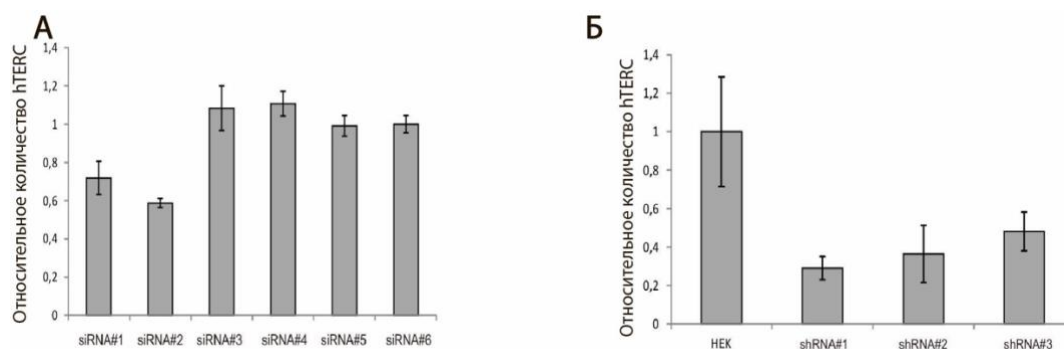


Рисунок 24. Эффективность снижения уровня экспрессии теломеразной РНК человека при помощи РНК-интерференции.

А. Влияние siRNA, взаимодействующих с разными областями теломеразной РНК, на ее количество в клетке.

Б. Влияние стабильной экспрессии shRNA, взаимодействующих с разными областями теломеразной РНК, на ее количество в клетке.

Анализ длины теломер выявил значительное укорочение концевых участков хромосом только в случае использования shRNA#2. Экспрессия shRNA#1 и 3 не оказала значительного влияния на длину теломер (рис. 25).

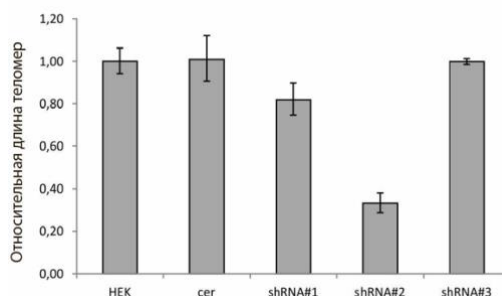


Рисунок 25. Снижение экспрессии гена теломеразной РНК человека приводит к укорочению теломер. Анализ длины теломер в клетках, экспрессирующих шпилечные РНК, взаимодействующие с теломеразной РНК человека.

Для проверки нашей гипотезы о нарушении сборки активного фермента благодаря блокированию участков теломеразной РНК, определяющих взаимодействия с обратной транскриптазой, мы оценили степень ингибирования теломеразной активности антисмысловыми олигонуклеотидами *in vivo* и *in vitro*. Обнаружено, что IC₅₀ олигонуклеотидов #1 и 2 *in vivo* составила 31,4 и 22,2 нМ (рис. 26А,Б), соответственно, и 1,2 и 3,5 нМ при добавлении их в экстракт клеток с повышенной экспрессией генов компонентов теломеразы (рис. 26В,Г) [159].

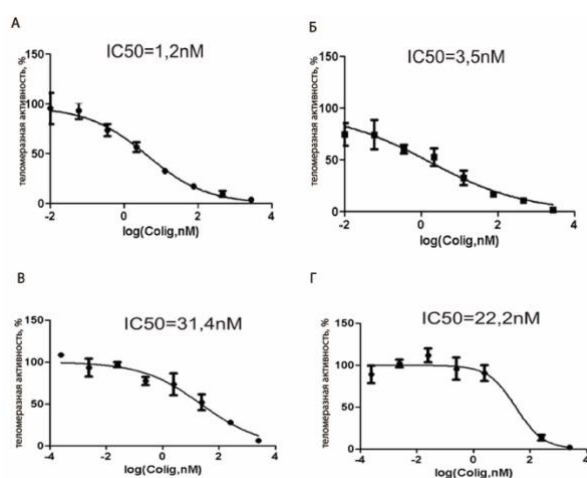


Рисунок 26. Антисмысловые олигонуклеотиды ингибируют активность теломеразы *in vivo* и *in vitro*.

А, Б. Кривая ингибирования активности теломеразы *in vivo* олигонуклеотидами #1 и 2, соответственно.

В, Г. Кривая ингибирования активности теломеразы *in vitro* олигонуклеотидами #1 и 2, соответственно.

Дополнительные исследования влияния блокировки структурных элементов теломеразной РНК на сборку активной теломеразы и активность фермента были проведены с использованием «химерных» олигорибонуклеотидов. Предложенный подход позволил фиксировать конформацию теломеразной РНК. Мы использовали конструкции, содержащие два олигонуклеотида комплементарные разным участкам теломеразной РНК, которые были соединены 1,3-пропандиоловым линкером

(рис. 27А). Оценивали ингибирование теломеразы *in vivo* «химерными» олигонуклеотидами, в которых одно плечо соответствовало #1 или 2, а второе было комплементарно домену CR4/5 (рис. 27Б).

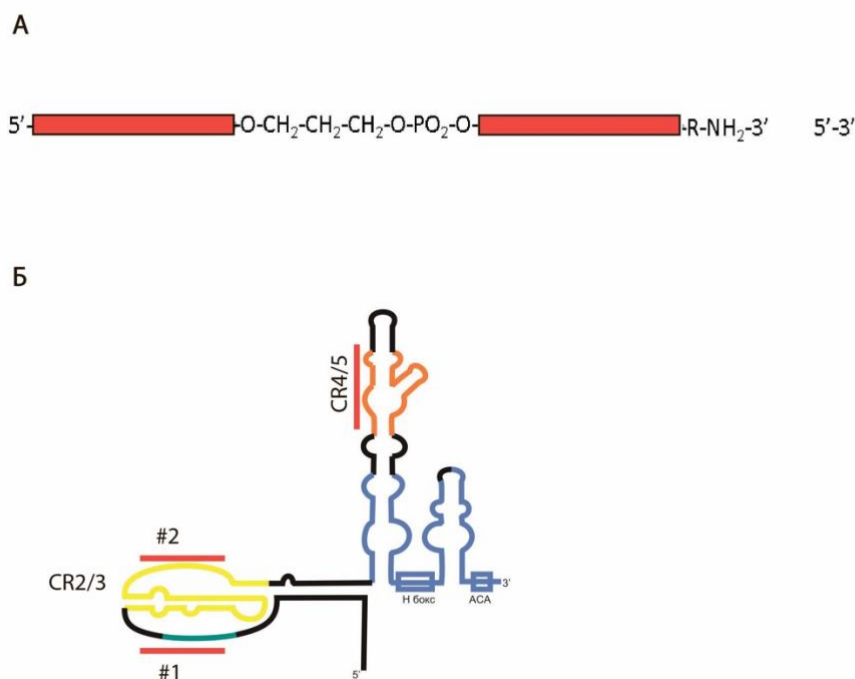


Рисунок 27. Химерные олигонуклеотиды, использованные для блокирования сборки теломеразного комплекса.

А. Схема строения химерных олигонуклеотидов.

Б. Участки взаимодействия «плечей» «химерных» олигонуклеотидов.

Оказалось, что «химерные» олигонуклеотиды снижают активность теломеразы эффективнее одиночных. Сравнивали олигонуклеотиды, содержащие одинаковые модифицированные н.о.. «Химерный» олигонуклеотид #1-CR4/5 ингибирует теломеразу в 2 раза эффективнее чем олигонуклеотид С3-#1 и в 20 раз (Таблица 3, 5), чем олигонуклеотид С3-CR4/5, а #2-CR4/5 – в 30 раз эффективнее, чем олигонуклеотид С3-#2 и в 10 раз, чем олигонуклеотид С3-CR4/5 (Таблица 3, 5).

Таблица 5. Способность олигонуклеотидов ингибировать активность теломеразы.

Название	IC ₅₀ , нМ	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
C3-#1	100±20	5,2±0,9
C3-#2	19±16	43±21
C3-CR4/5	>500	41,1±7,4
#1-CR4/5	35±18	2,2±0,8
#2-CR4/5	229±72	3,9±1,7

Значительная разница ингибирующих концентраций олигонуклеотидов при добавлении в экстракт и в условиях трансфекции позволило нам предположить, что «химерные» олигонуклеотиды влияют на сборку теломеразного комплекса. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели анализ взаимодействия hTERT с hTERC при помощи ультрацентрифугирования экстракта клеток в градиенте концентрации сахарозы (рис. 27А). Такой подход позволяет разделить свободную теломеразную РНК и ее комплекс с обратной транскриптазой. Анализ количества теломеразной РНК во фракциях, полученных после разделения градиента, продемонстрировал, что блокирование конформации при помощи «химерных» олигонуклеотидов приводит к снижению количества теломеразной РНК во фракции, соответствующей комплексу. Использование «химерного» олигонуклеотида с плечом комплементарным матричному участку приводило к снижению количества собранного комплекса до 40% от количества собранного комплекса в необработанных клетках. В случае использования олигонуклеотида, одно плечо которого комплементарно домену J2a/3 #2-CR4/5, теломеразный комплекс не собирался вовсе (рис. 28Б) [160].

Полученные нами данные позволяют предположить, что CR2/3 домен теломеразной РНК может находиться в двух конформациях. Формирование псевдоузла позволяет молекуле ассоциировать с обратной транскриптазой с

образованием активного фермента. Стабилизация второй конформации приводит к блокированию связывания с hTERT и формирования активного теломеразного комплекса. Мы продемонстрировали, что J2a/3 структурный элемент псевдоузла теломеразной РНК человека может быть использован в качестве мишени для ингибирования сборки теломеразного комплекса.

Применение «химерных» олигонуклеотидов, фиксирующих определенную конформацию теломеразной РНК, значительно усиливает эффективность ингибирования сборки теломеразы и теломеразной активности в сравнении с индивидуальными олигонуклеотидами. Таким образом, процесс сборки теломеразного комплекса является перспективной мишенью для разработки подходов к ингибированию теломеразы, а «химерные» олигонуклеотиды могут рассматриваться как потенциальные противоопухолевые препараты.

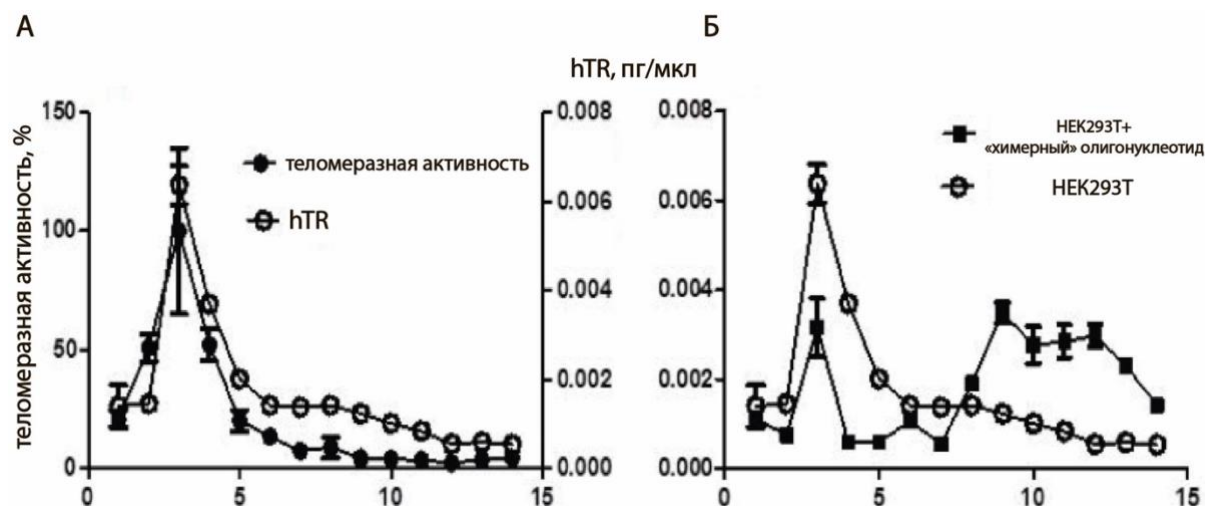


Рисунок 27. «Химерные» олигонуклеотиды блокируют сборку теломеразы.

А. Распределение теломеразной РНК человека и активности теломеразы по фракциям градиента концентрации сахарозы после ультрацентрифугирования экстрактов клеток линии HEK293Т.

Б. Распределение теломеразной РНК человека и активности теломеразы по фракциям градиента концентрации сахарозы после ультрацентрифугирования экстрактов клеток линии HEK293Т в нормальных условиях и в условиях культивирования с «химерным» олигонуклеотидом. В качестве примера приведен график распределения комплексов по фракциям градиента в условиях ингибирования теломеразы олигонуклеотидом #1-CR4/5.

3.2.2. Транскрипция и процессинг теломеразной РНК человека

Биогенез теломеразного комплекса является многостадийным процессом, каждый этап которого может быть использован для разработки различных подходов к регуляции фермента. Понимание молекулярных механизмов протекания каждой стадии биогенеза позволит выявить новые перспективные мишени для направленной регуляции. Теломеразная РНК человека является одним из двух коровых компонентов фермента, необходимых для каталитической активности фермента. Биогенез теломеразной РНК человека до сих пор недостаточно изучен. Созревание первичного транскрипта осуществляется в условиях конкуренции экзосомы, деградирующей РНК, и различных экзонуклеаз, осуществляющих точную коррекцию длины промежуточных интермедиатов. Молекулярный механизм регуляции транскрипции теломеразной РНК человека был недостаточно изучен.

Согласно данным предыдущих исследований, корректно процессированная теломеразная РНК человека образуется при использовании конструкций, экспрессия которых находится под контролем промоторов РНК-полимеразы II [90,161]. Экзогенная экспрессия гена *hTERC* под контролем нативного промотора, а также промотора гена U3 мРНК обеспечивает образование «зрелой» формы теломеразной РНК, а CMV-промотор стимулирует накопление непротессированного транскрипта [84].

Регуляцию работы РНК-полимеразы II осуществляет большое количество разнообразных белков, которые привлекают фермент к промоторным областям, способствуют инициации транскрипции, обеспечивают переход в элонгационную манеру синтеза РНК, способствуют реактивации транскрипции после пауз и т.д. Главными регуляторами активности РНК-полимеразы II являются комплексы Медиатор [162–164], участвующий в синтезе матричных РНК, и Интегратор, который вовлечен в транскрипцию генов некодирующих РНК и некоторых специфических мРНК (например, мРНК гистонов) [135,137,165]. Известно, что в регуляции

транскрипции и процессинга теломеразной РНК дрожжей *S.cerevisiae* участвует комплекс факторов терминации транскрипции Nrd1-Nab3-Sen1, который также привлекает экзосому и комплекс TRAMP (рис. 15) [95,96]. TRAMP осуществляет олигоаденилирование интермедиата теломеразной РНК. Короткая неструктурированная олиго(А)-последовательность является субстратом для экзосомы, гидролизующей РНК до тех пор, пока не встретит препятствие в виде комплекса Sm-белков, взаимодействующего со структурными элементами 3'-концевого участка TLC1 [97–99]. Исследования последних лет продемонстрировали, что процессинг теломеразной РНК человека осуществляет экзосома при участии TRAMP-комплекса. TRAMP добавляет олиго(А)-последовательность на 3'-конец интермедиата TERC, а гидролиз экзосомой ограничен комплексом H/ACA-белков, взаимодействующих с 3'-концевой шпилькой. Сходство механизмов процессинга теломеразных РНК *S.cerevisiae* и человека позволяет предположить, что в регуляции терминации транскрипции hTERC может участвовать гомолог комплекса Nrd1-Nab3-Sen1. В клетках человека не обнаружено гомологов белков Nrd1, Nab3 и Sen1. Предполагается, что Интегратор является функциональным аналогом белка Sen1 *S.cerevisiae* [165], который участвует в терминации транскрипции мРНК и мтРНК.

Мы решили изучить терминацию транскрипции теломеразной РНК человека и роль Интегратора в этом процессе. В настоящей работе использовали репортерные бицистронные конструкции на основе лентивирусного вектора LeGo-iG2 [138]. Первый цистрон в использованных конструкциях представлен последовательностью, соответствующей теломеразной РНК человека с дополнительными 3'-концевыми 425 н.о., представленными в геноме (рис. 28А). Второй цистрон кодирует зеленый флуоресцентный белок (GFP – green fluorescent protein). Цистроны разделены внутренним участком посадки рибосомы IRES-элементом. Мы получили набор бицистронных конструкций, в которых экспрессия репортера осуществляется под контролем разных промоторов. В работе использовали

промоторы SFFV (PSFFV) и гена β -актина курицы CbH1 (PCbH1), активность которого регулирует Медиатор, а также промотор гена U1 мяРНК (PU1), регулируемый Интегратором, и нативный промотор теломеразной РНК человека (PhTR) (рис. 28А). Дополнительно были созданы конструкции с химерными промоторами SFFV-hTR и hTR-SFFV.

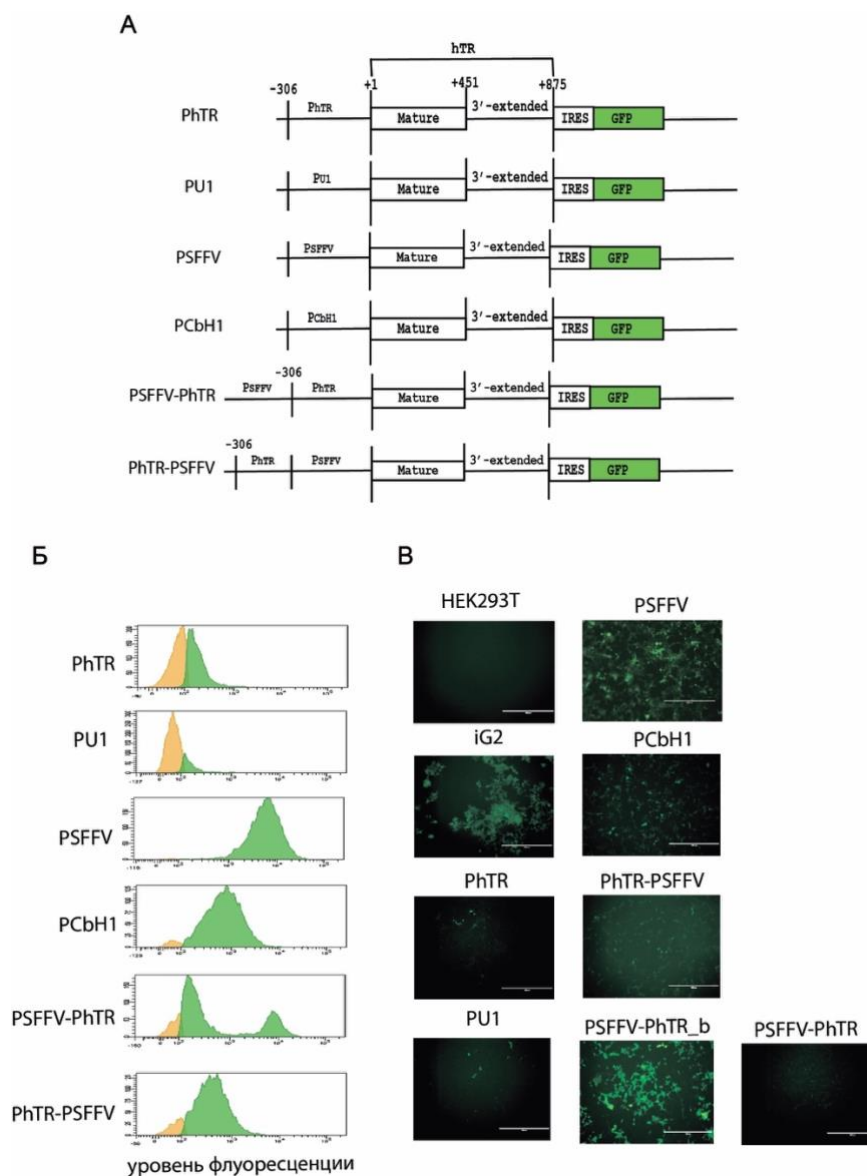


Рисунок 28. Репортерная система на основе бицистронной конструкции позволяет контролировать эффективность терминации транскрипции.

А. Схематичное изображение бицистронных конструкций под контролем разных промоторов.

Б. Анализ флуоресценции клеток, экспрессирующих бицистронные репортерные кассеты, методом цитофлуориметрии.

В. Флуоресценция клеток, экспрессирующих бицистронные репортерные кассеты, при помощи флуоресцентной микроскопии.

Мы получили стабильные клеточные линии, в геном которых интегрировали бицистронные экспрессионные кассеты, используя трансдукцию лентивирусными частицами с последующим отбором флуоресцентных клеток при помощи сортировки. Синтез GFP в клетке может происходить только в случае синтеза полноразмерной бицистронной РНК. В случае терминации транскрипции после первого цистрона уровень флуоресценции должен быть заметно снижен.

Мы обнаружили, что эффективная трансляция мРНК GFP осуществлялась в случае использования репортерных кассет под контролем промоторов, регулируемых Медиатором. Клетки, получившие репортерную конструкцию, экспрессию которой контролировал Интегратор, демонстрировали слабое фоновое свечение GFP (рис. 28Б,В). Слабый флуоресцентный сигнал наблюдали и в случае использования нативного промотора гена теломеразной РНК человека. Интересно, что клетки, трансдуцированные репортерными кассетами под контролем химерного промотора PhTR-SFFV, обладали низким уровнем флуоресценции, а промотор PSFFV-hTR позволил получить две популяции клеток (рис. 28Б,В). Мы разделили клетки двух популяций и анализировали каждую из них как самостоятельную клеточную линию. В дальнейшем клетки с высоким уровнем флуоресценции будут названы “яркие”, а с низким – “неяркие” (рис. 28Б,В). Разный уровень флуоресценции в клетках после вирусной трансдукции можно объяснить не только влиянием промотора и преждевременной терминацией транскрипции, но и эффективностью интеграции вирусных кассет в геном клетки. Возможно, что клетки получили разное количество копий репортерной кассеты, что может определять различия в уровне флуоресценции.

Мы определили количество копий репортерных кассет, интегрировавших в геном клеток, применив ПЦР в реальном времени (рис. 29). ПЦР в реальном времени проводили, используя в качестве матрицы геномную ДНК, выделенную из клеток полученных линий, и праймеры

специфичные последовательности, кодирующей GFP (Таблица 2). Нормализацию данных и расчет количества копий проводили, построив калибровочную прямую, на основе данных ПЦР в реальном времени, в которой в качестве матрицы использовали разные количества плазмиды, кодирующей GFP. Мы обнаружили, как и предполагали, что клетки действительно получили разное число копий экспрессирующих кассет. Однако, наблюдаемая тенденция обратна ожидаемой. Мы обнаружили большее количество копий кассет в клетках с низким уровнем флуоресценции и меньшее количество копий – в клетках с ярким свечением, что позволяет утверждать, что эффективность синтеза GFP не зависит от числа копий репортерной кассеты, встроенной в геном клеток (рис. 29).

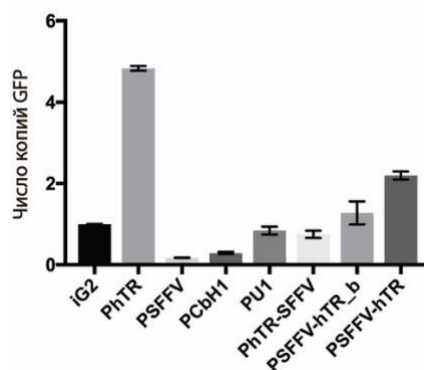


Рисунок 29. Количество копий GFP, трансдуцированных в геном клеток репортерных линий.

Разделение линии клеток, трансдуцированных вирусными частицами, несущими конструкции под контролем химерного промотора PSFFV-PhTR, на две популяции: яркую и неяркую – может произойти из-за появления мутаций в терминаторной области, возникших в процессе культивирования клеток или в результате использования аппаратом транскрипции разных частей регуляторной области.

Появление мутаций в бицистронной конструкции исключили, осуществив амплификацию участка, соответствующего теломеразной РНК человека, и секвенирование полученного продукта.

В целях проверки второй возможной причины разного уровня флуоресценции мы определили 5'-концы транскриптов, синтезированных в клеточных линиях PhTR, PSFFV и PSFFV-PhTR_b и PSFFV-PhTR при помощи 5'-RACE подхода (рис. 30А). Продукт обратной транскрипции с праймером специфичным теломеразной РНК человека был обработан терминальной трансферазой и амплифицирован. Терминальная трансфераза достраивает олиго-dC-последовательность на 5'-конце кДНК. В ПЦР используется пара праймеров (Таблица 2), один из которых (обратный) комплементарен последовательности теломеразной РНК человека, а другой (прямой) содержит несколько дезоксиинозинов, что позволяет ему эффективно взаимодействовать только с олиго-dC-последовательностью. Полученный ПЦР продукт секвенировали. Оказалось, что клетки, экспрессирующие конструкции под контролем промоторов PhTR и PSFFV, содержали только один тип продукта, соответствующий +1 положению теломеразной РНК, а клетки, в которых экспрессию кассеты контролировал химерный промотор PSFFV-PhTR, накапливали два типа транскриптов: дикого типа (+1 положение) и удлинённый с 5'-конца, в состав которого входил промотор PhTR (рис. 30Б).

Необходимо отметить, что клетки популяции со слабым уровнем флуоресценции содержали преимущественно транскрипт дикого типа, а в клетках, демонстрирующих яркое свечение GFP, SFFV-промотор выигрывал конкуренцию и происходила транскрипция более длинного продукта. Полученные данные позволяют утверждать, что именно промотор гена уже на стадии инициации транскрипции определяет события, которые произойдут при терминеции синтеза РНК. Можно предположить, что промотор определяет состав комплекса, который обеспечивает корректное протекание всех основных этапов транскрипции гена, включая как инициацию, так и элонгацию и даже терминецию этого процесса. Для доказательства зависимости положения терминеции транскрипции от природы промотора мы определили количество зрелой формы и удлинённого с 3'-конца

предшественника теломеразной РНК человека в полученных клеточных линиях, экспрессирующих бицистронные кассеты под контролем разных промоторов.

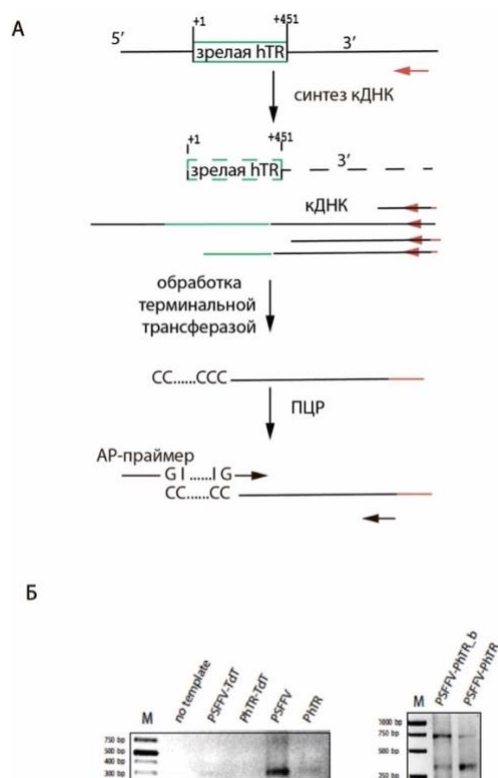


Рисунок 30. Эффективность терминации транскрипции бицистронной мРНК зависит от промотора.

А. Схема, иллюстрирующая принцип метода определения 5'-границы транскрипта 5'-RACE.

Б. Анализ положения старта транскрипции бицистронных конструкций в репортерных линиях при помощи 5'-RACE подхода. Образцы -TdT не были обработаны терминальной трансферазой.

Использовали пары праймеров, специфичные разным областям теломеразной РНК человека: «зрелой» форме и предшественнику, удлинённому с 3'-конца (рис. 31А, Таблица 2). Необходимо отметить, что данные о количестве теломеразной РНК, полученные при использовании праймеров, специфичных «зрелой» форме транскрипта, показывают нам общее количество всех форм hTERC в клетках. Данные о количестве теломеразной РНК человека, полученные при помощи обратной транскрипции

сопряженной с ПЦР в реальном времени, нормировали на количество копий GFP, интегрировавших в геном клеток. Мы наблюдали повышение общего количества теломеразной РНК в 2, 5, 394, 49, 32, 10, 12,5 и 3,6 раз для клеток PhTR, PSFFV, PCbH1, PU1, PhTR-PSFFV, PSFFV-PhTR_b и PSFFV-PhTR, соответственно, по сравнению с клетками, экспрессировавшими контрольную векторную конструкцию LeGo-iG2 (рис. 31А). Количество удлиненного предшественника возросло в 23, 30000, 2500, 82, 628, 1685 и 79 раз для клеток PhTR, PSFFV, PCbH1, PU1, PhTR-PSFFV, PSFFV-PhTR_b и PSFFV-PhTR, соответственно, по сравнению с клетками, экспрессировавшими контрольную векторную конструкцию LeGo-iG2 (рис. 31Б). Во всех случаях мы наблюдали изменение общего количества теломеразной РНК, что затрудняет оценивать эффективность терминации транскрипции. Чтобы оценить эффективность терминации транскрипции или процессинга теломеразной РНК человека независимо от изменения общего количества РНК мы решили нормировать количество удлиненного предшественника к общему количеству теломеразной РНК в клетке. Оказалось, что промоторы, регулируемые Интегратором, обеспечивают незначительное накопление непроцессированного продукта (в 9,6 и 2,3 раза в случае использования PhTR и PU1, соответственно), а промоторы, зависящие от Медиатора, вносят существенный вклад в накопление непроцессированного продукта (в 83, 52, 131 раз в случае использования PSFFV, PCbH1 и PSFFV-PhTR_b, соответственно) (рис. 31В).

Дополнительные доказательства зависимости терминации транскрипции hTERC от промотора были получены при анализе суммарной клеточной РНК методом гибридизации по Нозерну. Для этого суммарную клеточную РНК разделили при помощи электрофореза в ПААГ, перенесли на мембрану и гибридизовали с радиоактивно-мечеными зондами, специфичными теломеразной РНК человека, мРНК GFP и 7SL РНК (Таблица 4), используемой в качестве контроля нанесения.

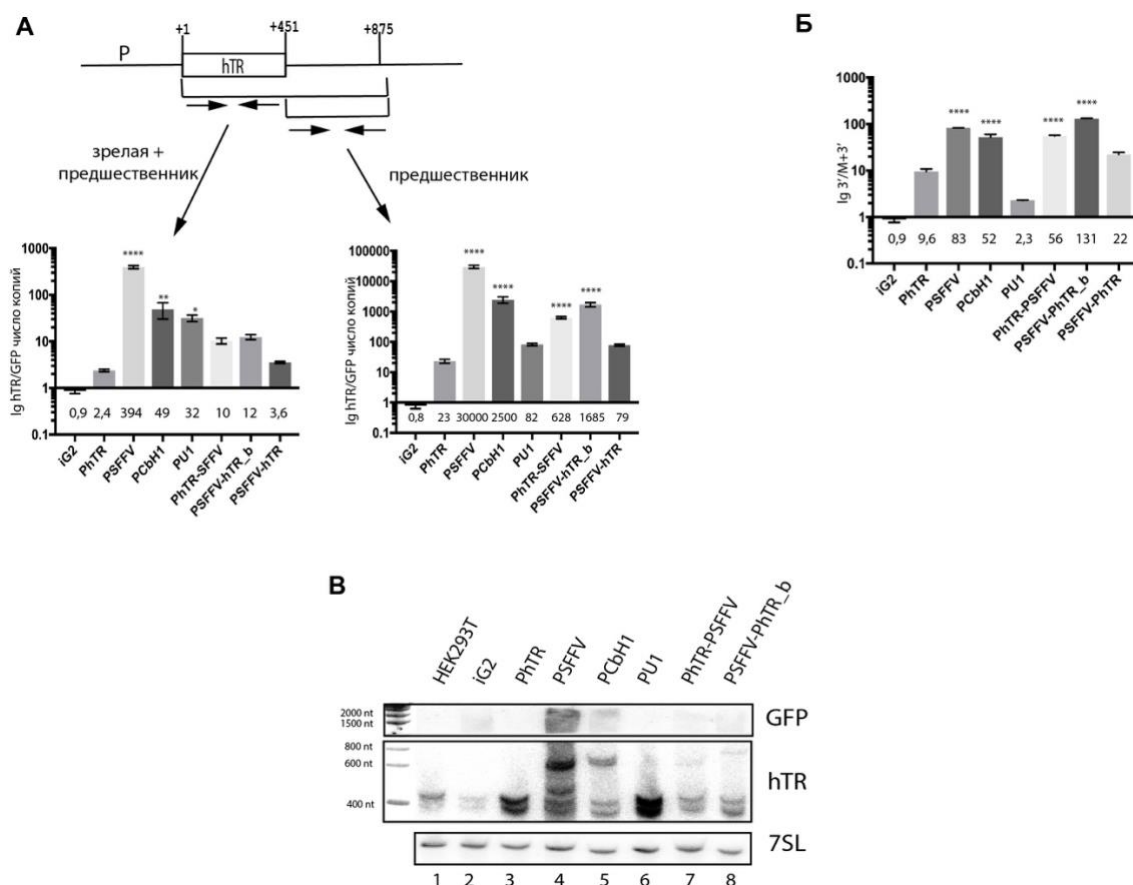


Рисунок 31. Терминация транскрипции гена теломеразной РНК человека зависит от промотора.

А. Схематичное изображение транскрипта теломеразной РНК человека, использованных для анализа количества «зрелой» формы теломеразной РНК и ее предшественника. Гистограммы, демонстрирующие количество «зрелой» теломеразной РНК человека (слева) и ее предшественника (справа) в клетках репортерных линий, согласно результатам обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество hTR нормировали на количество мРНК GAPDH и на число копий GFP в геноме клеток. **** обозначает $P < 0,0001$, ** -- $P < 0,01$ и * -- $P < 0,1$, статистическая значимость рассчитана с использованием метода Шидека для множественных сравнений.

Б. Гистограмма, демонстрирующая эффективность процессинга теломеразной РНК человека, согласно результатам обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Данные получены в результате нормировки количества непротрансформированной формы на суммарное количество теломеразной РНК человека.

В. Зависимость терминации транскрипции гена теломеразной РНК человека от промотора, согласно данным Нозерн-блоттинга. Верхняя панель представляет результат гибридизации мембраны с зондом специфичным мРНК GFP, средняя – hTR, нижняя – 7SL РНК (контроль нанесения).

Мы обнаружили, что корректно процессированная зрелая форма теломеразной РНК человека накапливается в случае использования нативного промотора и промотора U1 мРНК (PhTR и PU1). Использование других промоторов приводило к появлению дополнительного промежуточного продукта длиной около 600 н.о., а также бицистронной мРНК, выявленной при помощи гибридизации с зондом специфичным мРНК GFP (рис. 31B).

В настоящий момент известно, что в состав Интегратора входит 14 компонентов. Мы выбрали 3 компонента Интегратора для проверки гипотезы об участии Интегратора в регуляции транскрипции гена теломеразной РНК человека. INTS1 является самым большим белком, входящим в состав Интегратора, и представляет собой каркас для сборки всего мультикомпонентного комплекса [135]. INTS9 и INTS11 участвуют в процессинге 3'-концов синтезируемых транскриптов. INTS11 является гомологом главного фактора, вносящего разрыв на 3'-конце синтезируемых мРНК, CPSF73, а INTS9 – гомолог CPSF100, который координирует разрезание синтезируемого транскрипта и терминацию транскрипции, а также вовлечен в регуляцию перехода РНК-полимеразы II к процессивной элонгации после остановки. Функции остальных субъединиц Интегратора мало изучены.

Ингибирование экспрессии генов субъединиц Интегратора проводили в клетках HEK293T дикого типа при помощи siRNA описанных ранее в литературе [135,137,165]. В качестве контроля специфичности использовали по две siRNA для ингибирования экспрессии каждого гена и siRNA, комплементарную последовательности, кодирующей люциферазу светлячка.

Эффективность нокдауна генов определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. В дальнейших экспериментах по ингибированию экспрессии генов компонентов Интегратора использовали только одну siRNA, которая наиболее эффективно снижала уровень экспрессии целевого гена. В ходе этого эксперимента мы оценили взаимовлияние экспрессии генов различных субъединиц Интегратора. В случае нокдауна гена INTS1 были определены уровни мРНК

как *INTS1*, так и *INTS9*, и *INTS11* (рис. 32А,Б,В). Оказалось, что экспрессия генов компонентов Интегратора регулируется по механизму обратной связи. Мы наблюдали повышение экспрессии хотя бы одной из двух нецелевых для siRNA субъединиц Интегратора при снижении экспрессии целевого гена. В случае нокдауна гена *INTS1* происходит усиление экспрессии генов *INTS9* и *INTS11*, в случае нокдауна гена *INTS11* увеличивается количество мРНК *INTS1* и *INTS9* (рис. 32А,В). Нокдаун *INTS9* практически не влияет на экспрессию других исследуемых компонентов Интегратора (рис. 32Б). Можно предположить, что отдельные компоненты комплекса Интегратор вовлечены в регуляцию экспрессии других компонентов. Механизм регуляции экспрессии компонентов Интегратора требует дальнейшего исследования.

Известно, что Интегратор является ключевым регулятором формирования 3'-конца мРНК [165]. Мы решили использовать данные об изменении количества зрелой формы и непротессированной с 3'-конца U2 мРНК в условиях нокдауна генов компонентов Интегратора в целях подтверждения специфичности используемых siRNA (рис. 32Г). Количества разных форм U2 мРНК определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени, используя праймеры специфичные «зрелому» или 3'-удлиненному транскрипту (Таблица 2). Используя праймеры, специфичные «зрелой» форме U2 мРНК, мы определяем общий уровень экспрессии гена, а праймеры, специфичные непротессированной форме, позволяют нам определить количество только 3'-удлиненного транскрипта. В дальнейшем вычисляли отношение количества непротессированного транскрипта к количеству зрелой формы РНК, чтобы исключить вклад глобального изменения уровня экспрессии U2 мРНК в результате нокдауна компонентов Интегратора.

Нокдаун гена *INTS1* приводит к снижению эффективности процессинга U2 мРНК в 9 раз, а снижение уровня экспрессии *INTS9* и *INTS11* повышает количество непротессированной формы в 2,1 и 1,8-раз, соответственно, по сравнению с клетками, обработанными siRNA специфичной гену люциферазы

светлячка. Таким образом мы дополнительно подтвердили специфичность работы использованных нами siRNA (рис. 32Г).

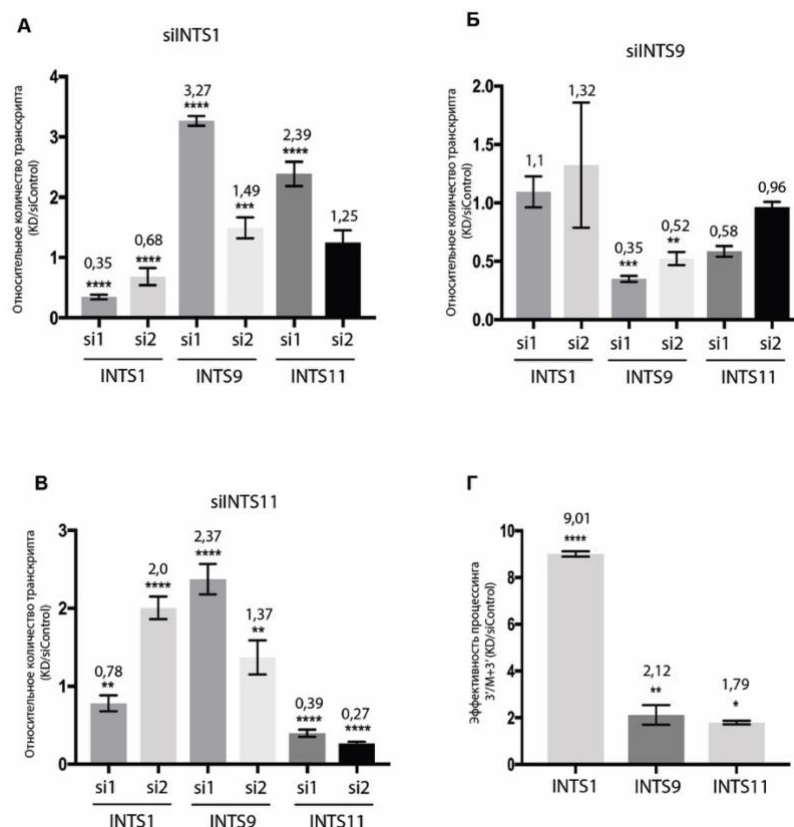


Рисунок 32. Экспрессия генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 регулируется по механизму обратной связи. Ингибирование экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 снижает эффективность процессинга U2 мяРНК.

А. Изменение экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 в условиях ингибирования экспрессии *INTS1*.

Б. Изменение экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 в условиях ингибирования экспрессии *INTS9*.

В. Изменение экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 в условиях ингибирования экспрессии *INTS11*.

Г. Эффективность процессинга U2 мяРНК в условиях ингибирования экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11.

Уровень экспрессии анализировали методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество целевых РНК нормировано на контрольную мРНК GAPDH и на количество копий GFP в геноме клеток. **** обозначает $P < 0,0001$, *** -- $P < 0,001$, ** -- $P < 0,01$ и * -- $P < 0,1$, статистическая значимость получена с использованием метода Шидака для множественных сравнений.

Мы предполагали, что Интегратор вовлечен в регуляцию транскрипции и формирования 3'-конца теломеразной РНК человека. Предыдущие эксперименты продемонстрировали, что «зрелая» форма теломеразной РНК формируется при экспрессии репортерных конструкций только под контролем промоторов, регулируемых Интегратором (рис. 31). Для подтверждения участия Интегратора в биогенезе теломеразной РНК человека мы определили изменение эффективности процессинга транскрипта в условиях нокдауна компонентов Интегратора. Определяли общий уровень экспрессии теломеразной РНК человека, используя праймеры (Таблица 2), специфичные «зрелой» форме транскрипта, а также количество 3'-удлиненной формы, проводя обратную транскрипцию ПЦР сопряженную с ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными непроцессированному транскрипту.

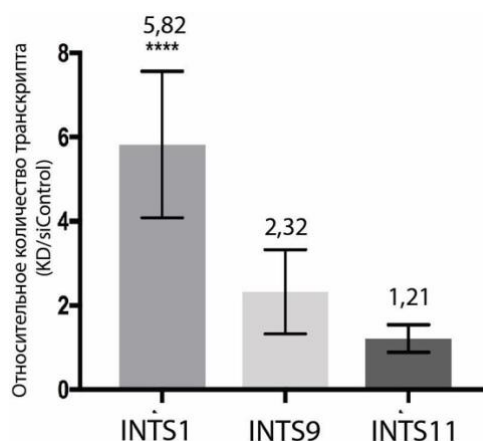


Рисунок 38. Эффективность процессинга теломеразной РНК человека в условиях ингибирования экспрессии генов компонентов Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11.

Уровень экспрессии анализировали методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество теломеразной РНК человека нормировано на контрольную мРНК GAPDH и на количество копий GFP в геноме клеток. **** обозначает $P < 0,0001$, статистическая значимость получена с использованием метода Шидака для множественных сравнений.

Оказалось, что нокдаун *INTS1* снижает эффективность процессинга в 6 раз, а снижение уровня экспрессии генов *INTS9* и *INTS11* приводит к накоплению непроцессированной формы теломеразной РНК человека в 2,3 и

1,2 раза, соответственно, в сравнении с клетками, обработанными siRNA, специфичной гену люциферазы светлячка (рис. 38). Таким образом, мы подтвердили, что Интегратор участвует в регуляции транскрипции теломеразной РНК человека [166].

Несмотря на интенсивные исследования последних лет, точная длина первичного транскрипта теломеразной РНК человека, также, как и положение терминирования транскрипции до сих пор остаются неизвестным. Известно, что Интегратор, привлекая различные факторы, участвует в регуляции всех стадий транскрипции и последующего процессинга РНК [167].

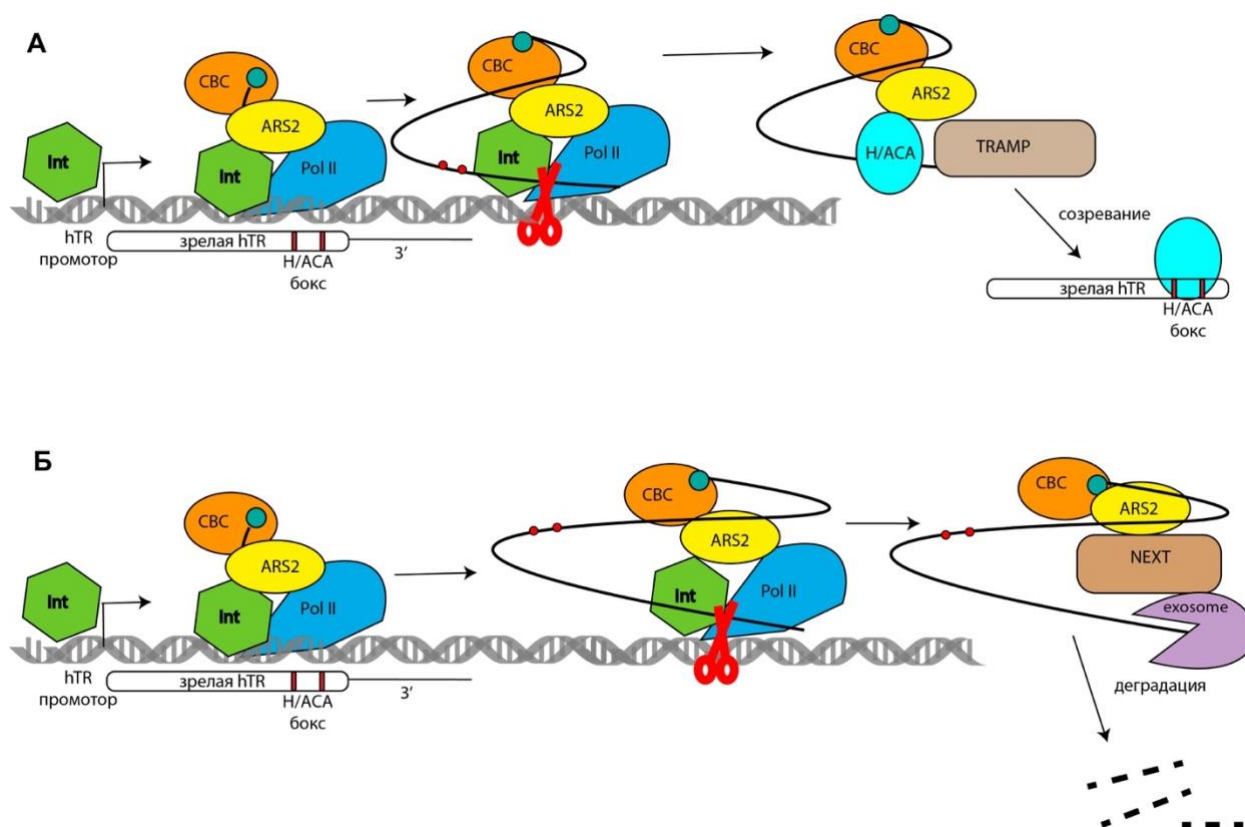


Рисунок 39. Схема, иллюстрирующая молекулярный механизм транскрипции и котранскрипционного процессинга теломеразной РНК человека.

Процессинг 3'-конца теломеразной РНК человека осуществляется котранскрипционно при участии CBCA и NEXT-комплексов [81,91]. Ассоциация CBCA-комплекса с Интегратором через взаимодействие с белком

NELF способствует корректному процессингу 3'-концов мРНК [168]. Можно предположить, что в случае биогенеза теломеразной РНК человека СВСА и NEXT-комплексы, а также экзосома могут привлекаться при участии Интегратора (рис. 39).

В условиях снижения количества Интегратора в клетках эффективность привлечения процессирующего комплекса на синтезируемый транскрипт будет ингибирована, что приведет к накоплению первичного транскрипта, не подвергшегося укорочению с 3'-конца. Увеличение количества непротрансценсированного транскрипта может позволить определить положение 3'-конца первичного транскрипта теломеразной РНК человека. Мы использовали клетки, обработанные siRNA специфичной к мРНК INTS1, а также клетки, экспрессирующие репортерные конструкции под контролем промоторов PhTR и PSFFV, для определения положения терминации транскрипции гена *hTERC*. 3'-конец определяли при помощи методики 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (рис. 40А), с последующим пиротеквенированием полученных ампликонов.

На первом этапе проводили лигирование адаптерного праймера к фракции тотальной РНК, выделенной из исследуемых клеток. Обратную транскрипцию и последующий ПЦР проводили при помощи обратного праймера, комплементарного адаптерному, и прямого праймера, комплементарного участку, выходящему за пределы «зрелой» формы теломеразной РНК человека. Таким образом мы получали ПЦР-продукты, соответствовавшие только непротрансценсированному транскрипту. В результате секвенирования мы выявили набор продуктов, диапазон длин которых соответствовал удлинённой теломеразной РНК на 30-400 н.о., в случае клеток, экспрессирующих репортерную конструкцию под контролем промотора PSFFV (рис. 40Б), ни одного продукта для клеток PhTR и клеток, обработанных siRNA, специфичной гену люциферазы светлячка, и накопление продукта, удлинённого на 120 н.о., для клеток со сниженной экспрессией гена *INTS1* (рис. 40В).

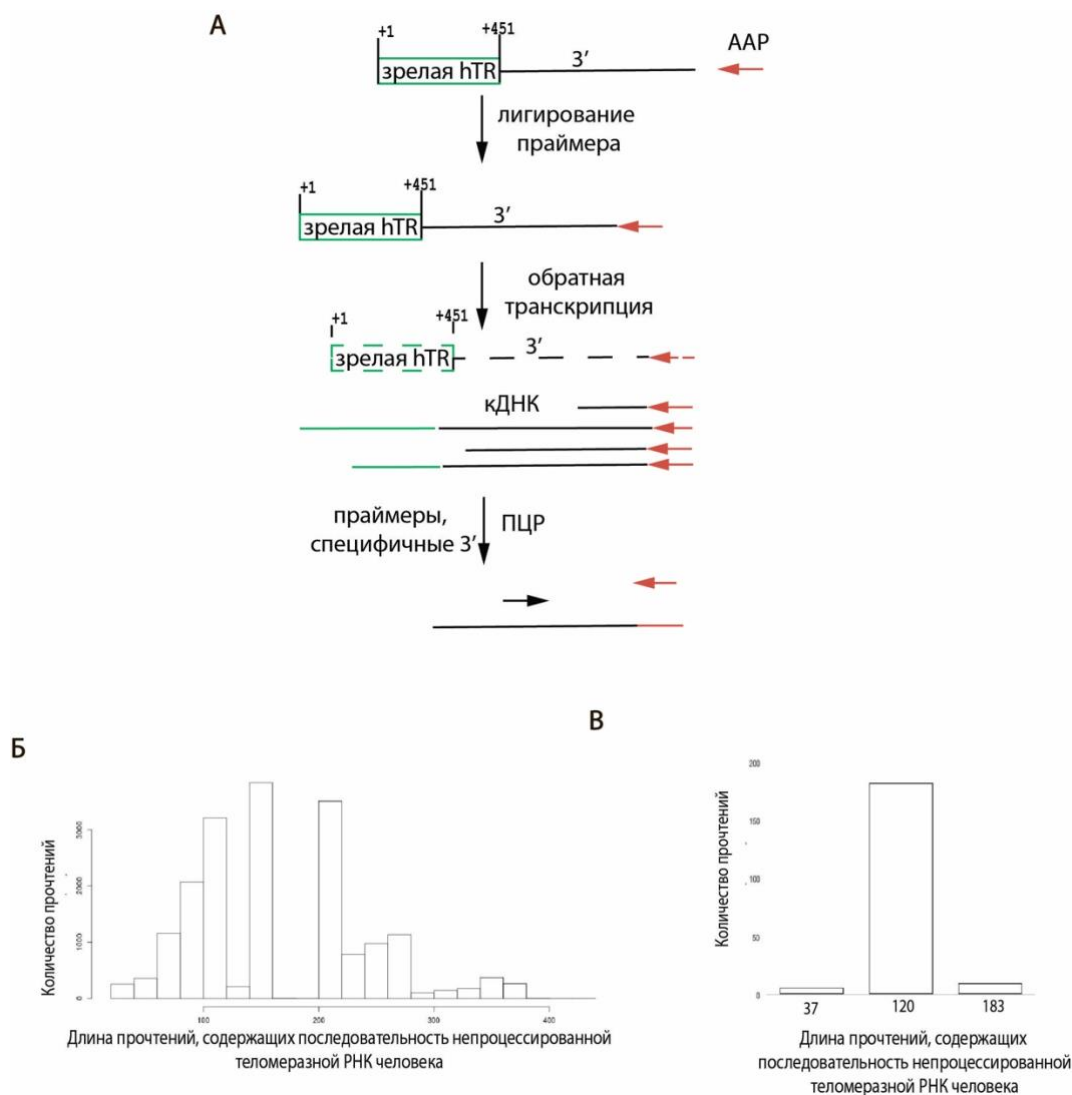


Рисунок 40. Определение длины транскрипта теломеразной РНК человека.

А. Схема, иллюстрирующая принцип метода определения 3'-границы транскрипта 3'-RACE.

Б. Распределение количества прочтений непероцессированной формы теломеразной РНК человека по длине транскрипта в клетках линии, экспрессирующей бицистронную кассету под контролем SFFV-промотора.

В. Распределение количества прочтений непероцессированной формы теломеразной РНК человека по длине транскрипта в клетках HEK293T со сниженным количеством мРНК INTS1.

Биогенез теломеразной РНК является одним из ключевых механизмов, регулирующих работу теломеразы. Мутации в компонентах клетки, вовлеченных в процессинг теломеразной РНК человека, ассоциированы с патологиями, характеризующимися нарушениями функционирования

теломеразы и поддержания длины теломер. Исследования последних лет выявили конкуренцию процессинга первичного транскрипта теломеразной РНК человека с образованием ее «зрелой» формы и деградации hTERC при участии экзосомы. В настоящем исследовании мы продемонстрировали участие мультисубъединичного комплекса Интегратор, одного из регуляторов транскрипции и котранскрипционного процессинга синтезируемых РНК, в биогенезе теломеразной РНК человека. Полученные нами данные в совокупности с исследованиями последних лет позволяют предполагать, что именно Интегратор отвечает за привлечение компонентов, участвующих в процессинге или деградации, к новосинтезируемому транскрипту теломеразной РНК человека, что позволяет поддерживать физиологический уровень теломеразной РНК человека в клетке.

3.2.3. Теломеразная РНК человека -- матрица для синтеза белка, обладающего защитными свойствами

Изучая роль Интегратора в биогенезе теломеразной РНК человека, мы продемонстрировали накопление транскрипта длиной 571 н.о. в условиях ингибирования экспрессии *INTS1*. Существование транскриптов теломеразной РНК человека длиной до 1500 н.о. было показано ранее при помощи методов глобального секвенирования [81]. Мутации в теломеразной РНК человека, нарушающие ее процессинг также, как и мутации в компонентах, вовлеченных в ее биогенез, приводят к накоплению hTERC в цитоплазматических тельцах суTER [91,104,169]. Работы, связанные с глобальным анализом рибосом-ассоциированных РНК, показывают, что hTERC локализуется в полисомной фракции, т.е. взаимодействует с транслирующими рибосомами. Интересно, что количество теломеразной РНК человека в полисомной фракции превышает количество мРНК hTERT [170,171]. Совокупность данных о свойствах, структуре и биогенезе

теломеразной РНК человека позволяет предположить, что она обладает кодирующим потенциалом.

Биоинформатический анализ первичной структуры гена теломеразной РНК человека выявил наличие открытой рамки считывания, кодирующей белок, состоящий из 121 аминокислотного остатка. Открытая рамка считывания начинается со 176 н.о. гена теломеразной РНК человека и выходит за границу «зрелой» формы hTERC (рис. 41А). Белок, названный hTERP – human Telomerase RNA Protein, имеет молекулярную массу 13 кДа. hTERP обогащен положительно-заряженными аминокислотными остатками и обладает рассчитанной изоэлектрической точкой pI 11,7.

А

```

ggguugcgaggggugggccugggagggguggggccauiuuuuugucuaacccuaacugagaagggcguaaggcgccgu
gcuuuugcucucccgcgcguguuuuucucgugacuucacgcgggcggaagccucggccugccgcuuccaccgcu
ucauucuagagcaaaacaaaaAUGucagcugcugggccgguucgccccuccggggaccugcggggucgcccugccc
M S A A G P F A P P G D L R R V A C
agccccgaaccccgccugggagggcgggucggccggggcgccggagggcaccuacugccaccgccaagaguug
P A P E P R L E A A V G P G L L R R H P L P P R R V
ggcucugucagccgcgggucucgggggcgagggcgagguucaggccuuucaggccgcaggaagaggaacggagcg
G L C Q P R V S R G R G R G S G L S G R R K R N G A
agucscgcgcgcgcggaauuccugagcugugggacgugcaccagggacucgggcucacacaugcaguucgcuuuc
S P R A R R D S L S C G T C T Q D S A H T C S S L
cuguuggggggggaacggcgauccgugcgcauccgucacccucgcccgcagugggggcuugugaaccccaaacu
S C W W G E E R R S C A S V T P R R Q W G L V N P Q T
qacucacucgqccca

```

Б

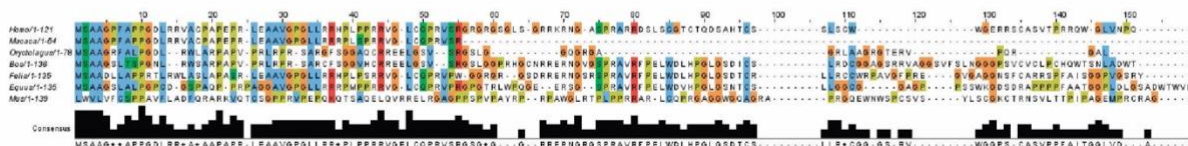


Рисунок 41. Теломеразная РНК человека кодирует открытую рамку считывания.

А. Последовательность открытой рамки считывания, обнаруженной в гене теломеразной РНК человека.

Б. Биоинформатическое выравнивание последовательностей открытых рамок считывания, обнаруженных в теломеразных РНК человека, гориллы, мыши, быка и лошади.

Визуализация выравнивания проведена в программе JalView.

Консервативность аминокислотной последовательности свидетельствует о функциональности кодируемого белка. Мы провели анализ

последовательности TERP из разных организмов и обнаружили 30% гомологию последовательностей гипотетических белков из 10 позвоночных (рис. 41Б): человека, шимпанзе, гориллы, лошади, свиньи, коровы, мыши, лягушки, рыб *Danio rerio* и *Gasterosteus aculeatus*. Анализ гомологии гипотетических белков сравнимой длины (121 а.о. для человека, 113 а.о. для кота, 106 а.о. для лошади и 139 а.о. для мыши) выявил, что они идентичны как минимум на 40% и обогащены аминокислотными остатками Arg, Gly и Pro.

Программы предсказания физико-химических свойств белков по первичной структуре относят hTERP к классу так называемых нативно-неструктурированных белков ((Intrinsically Unstructured Proteins (IUPs), Intrinsically Disordered Proteins (IDPs)) [172,173]. Известно, что нативно-неструктурированные белки функционируют в составе различных мультикомпонентных комплексов. Скорость эволюции нативно-неструктурированных белков повышена по сравнению с белками, поддерживающими точную структуру. Сходство аминокислотных последовательностей гомологов нативно-неструктурированных белков из разных организмов низко, т.к. корректное функционирование требует поддержания заряда и гидрофобности белка.

В целях выявления уникальных пептидов hTERP, когда-либо обнаруженных при исследованиях протеомов клеток, мы провели анализ архива протеомной базы данных PRIDE Archive [174]. Проводили виртуальное расщепление hTERP разными протеазами при помощи программы Peptide Cutter [175]. Поиск полученных последовательностей пептидов в базе данных PRIDE позволил обнаружить 11 уникальных пептидов из hTERP, выявленных в ходе исследований интерактом транскрипционных факторов [176], тирозиновых фосфатаз [177] и циклин-зависимых киназ [178] в клетках HEK293T.

Синтез белка осуществляется рибосомами в цитоплазме клеток. Косвенные данные свидетельствуют о накоплении теломеразной РНК человека в цитоплазме при нарушении ее процессинга [104]. Доказательство

локализации теломеразной РНК человека проводили, разделяя экстракт клеток НЕК293Т на цитоплазматическую и ядерную фракции [131].

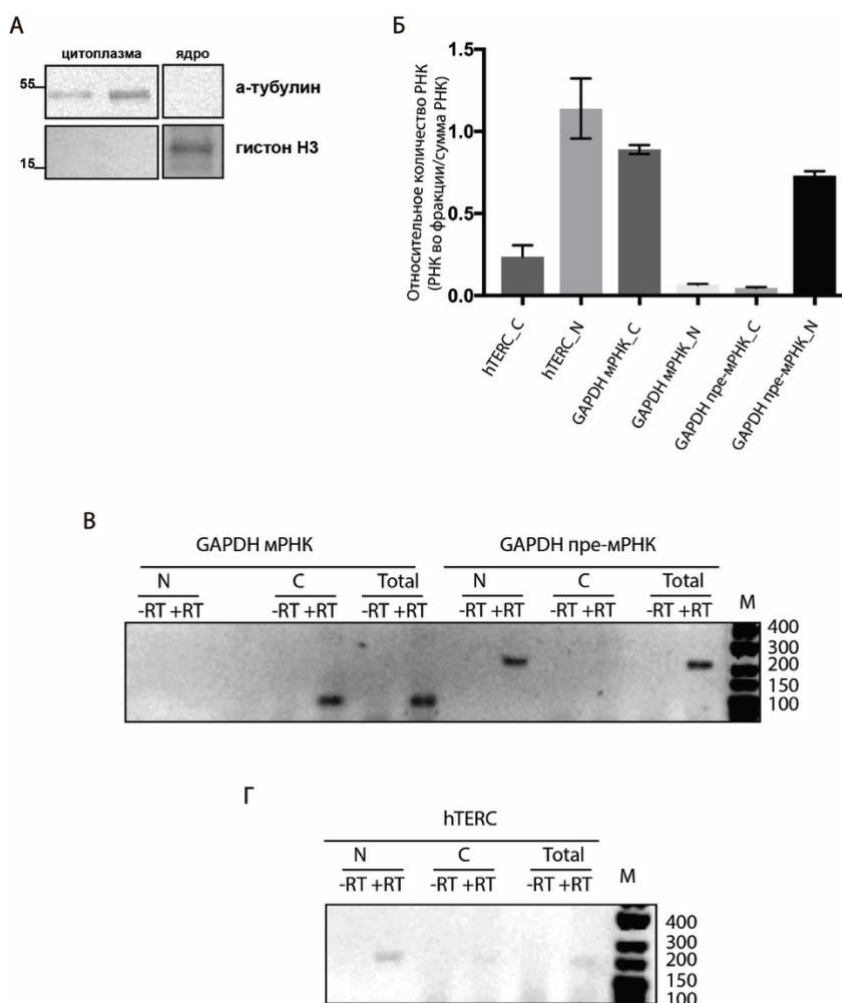


Рисунок 42. Теломеразная РНК человека локализуется в ядре и цитоплазме.

А. Анализ разделения ядерной и цитоплазматической фракций экстракта при помощи метода Вестерн-блоттинга. Проверяли содержание α-тубулина и гистона H3 в экстрактах.

Б. Анализ содержания РНК в ядерной и цитоплазматической фракциях клеточного экстракта. Количество РНК определяли при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Количество РНК во фракции нормировали на ее количество во фракции суммарной клеточной РНК. В качестве контроля разделения фракций использовали мРНК GAPDH. Сплайсированная мРНК содержится в цитоплазме, а несплайсированная пре-мРНК – в ядре.

В. Анализ продуктов обратной транскрипции сопряженной с ПЦР для мРНК и пре-мРНК GAPDH методом электрофореза в агарозном геле.

Г. Анализ продуктов обратной транскрипции сопряженной с ПЦР для hTERC методом электрофореза в агарозном геле.

РНК, выделенную из полученных фракций, использовали для определения количества теломеразной РНК человека методом обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Качество разделения фракций подтверждали при помощи Вестерн-блоттинга. Мы продемонстрировали, что после разделения цитоплазматической и ядерной фракции, α -тубулин находится в цитоплазме и перинуклеарной фракции, а гистон H3 – только в ядре (рис. 42А).

Контроль разделения РНК между ядром и цитоплазмой осуществляли, определяя количество несплайсированной и сплайсированной форм мРНК *GAPDH* при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени. Содержание РНК в каждой фракции оценивали как долю от общего содержания этой РНК во фракции суммарной клеточной РНК, которую находили как отношение Ct в анализируемой фракции к Ct в тотальной РНК. Данные представляли в виде гистограммы (рис. 42Б). Соответствие продукта ожидаемому анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле ПЦР смеси после амплификации продукта обратной транскрипции (рис. 42В). Мы обнаружили, что полностью сплайсированная форма мРНК *GAPDH* находится в цитоплазматической фракции, а несплайсированная пре-мРНК – в ядерной. Таким образом, предложенный метод может быть использован для установления локализации теломеразной РНК человека.

Анализ содержания hTERC в ядерной и цитоплазматической фракциях выявил, что 20-30% теломеразной РНК находится в цитоплазматической фракции (рис. 42Б,Г) и может быть использована в качестве матрицы для синтеза белка.

Идентификацию белка hTERP в клетках человека осуществляли при помощи трех различных независимых подходов. Последовательность теломеразной РНК человека, кодирующую hTERP, клонировали в вектор pET32b+ и экспрессировали в *E.coli*. Белок выделяли при помощи аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, благодаря наличию 6His-эпитопа в экспрессионной кассете. Очищенный белок использовали для иммунизации

кролика. Иммунизацию проводили на базе вивария Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина.

Сыворотку крови иммунизированного кролика использовали для выделения IgG-фракции антител при помощи белок G-сефарозы. Полученную IgG фракцию инкубировали ночь с экстрактом клеток линии VA13, которые не содержат hTERC, и проводили аффинную очистку антител специфичных к hTERP, используя NHS-сефарозу, предварительно конъюгированную с рекомбинантным hTERP.

Полученные антитела использовали для идентификации белка hTERP при помощи иммунофлуоресцентного анализа и методом Вестерн-блоттинга. Идентификацию белка методом иммунофлуоресцентного анализа и Вестерн-блоттинга проводили, используя клетки почки эмбриона человека HEK293T, фибросаркомы HT1080, Т-лимфоцитов человека Jurkat и фибробластов легкого эмбриона VA13. Клетки линии VA13 не содержат теломеразной РНК согласно литературным данным [179].

Для визуализации hTERP в клетках использовали первичные антитела специфичные hTERP. Методом флуоресцентной микроскопии мы обнаружили распределение специфичного сигнала в объеме теломеразо-позитивных (содержащих теломеразную РНК) клеток, а в клетках теломеразо-негативной линии VA13 флуоресценция не была выявлена (рис. 43А). Ядро клеток окрашивали DAPI. Уровень экспрессии *hTERC* в используемых клетках подтверждали при помощи обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени (рис. 43Б). Метод Вестерн-блоттинга выявил наличие белка hTERP в клетках теломеразо-позитивных линий (рис. 43В) и его отсутствие в клетках линии VA13 (рис. 43Г).

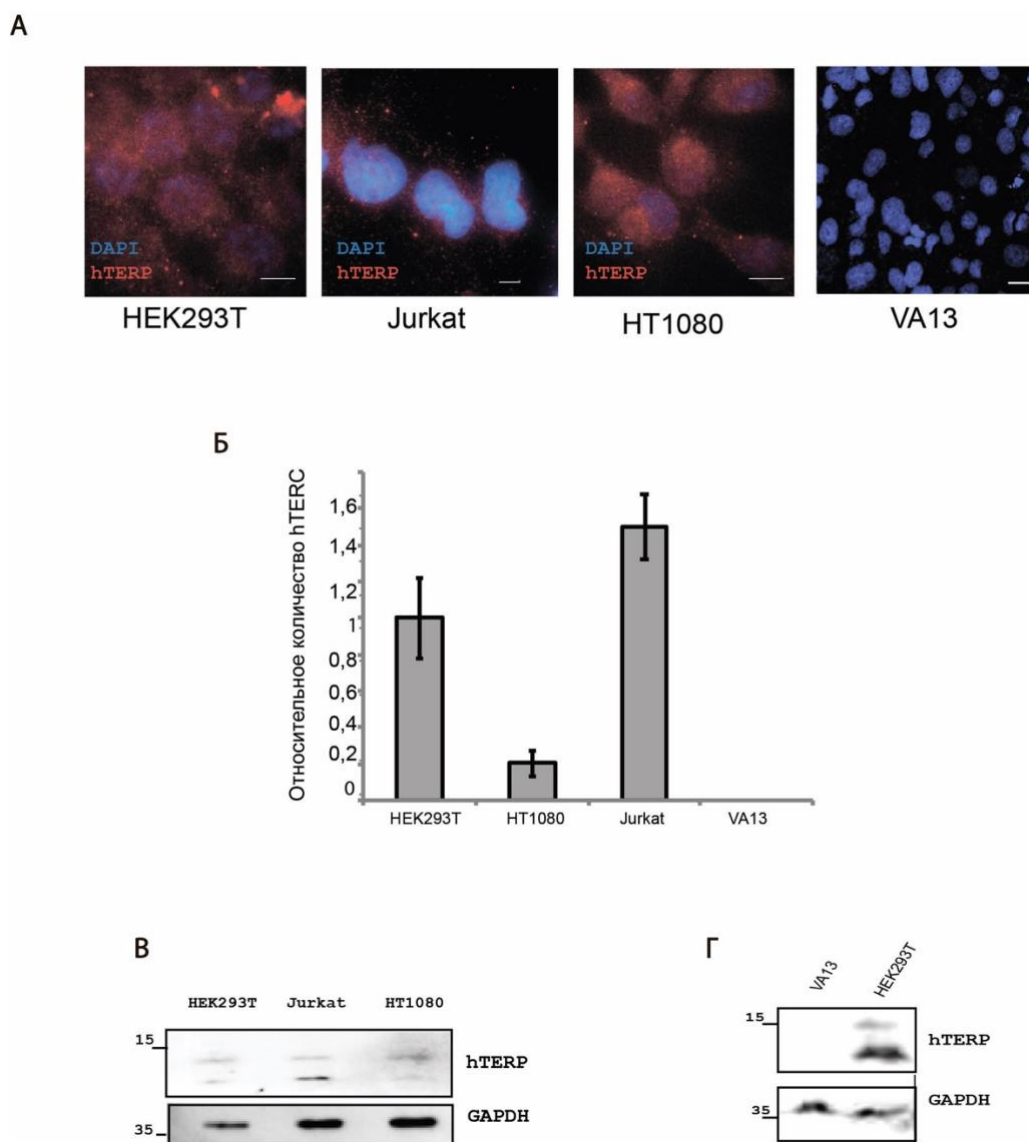


Рисунок 43. hTERP присутствует в теломеразо-положительных клетках (HEK293T, Jurkat, HT1080) и отсутствует в теломеразо-негативных клетках VA13.

А. Анализ содержания hTERP в клетках линий HEK293T, Jurkat, HT1080 и VA13 методом иммунофлуоресцентного анализа. DAPI -- синий, hTERP – красный.

Б. Содержание теломеразной РНК человека в клетках линий HEK293T, Jurkat, HT1080 и VA13, согласно результатам обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени.

В. Анализ содержания hTERP в клетках линий HEK293T, Jurkat и HT1080 методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель – hTERP, нижняя панель – GAPDH – контроль нанесения.

Г. Анализ содержания hTERP в клетках линий HEK293T и VA13 методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель – hTERP, нижняя панель – GAPDH – контроль нанесения.

Снижение экспрессии hTERC в клетках HEK293T при помощи РНК-интерференции с применением двух разных shRNA [159] (рис. 44А) уменьшает количество белка hTERP (рис. 44Б), согласно данным Вестерн-блоттинга. Экзогенная экспрессия hTERC дикого типа, но не ее мутантных форм (рис. 44В,Г), в которых нарушена открытая рамка считывания белка hTERP, приводит к появлению специфического сигнала в клетках линии VA13, что было выявлено при помощи иммуофлуоресцентной микроскопии (рис. 44Д) и Вестерн-блоттинга (рис. 44Е).

Анализ клеток методом иммуофлуоресцентной микроскопии выявил специфический сигнал в клетках линии VA13 в условиях экзогенной экспрессии hTERC дикого типа и мутантной формы, кодирующей 17 а.о. N-концевой пептид (рис. 44Д), длина которого не позволяла выявить его при использовании метода Вестерн-блоттинга (рис. 44Е). Мы не наблюдали возникновения позитивного сигнала в клетках VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК человека с инактивированным стартовым кодоном в открытой рамке считывания ни методом иммуофлуоресцентной микроскопии, ни Вестерн-блоттингом (рис. 44Д,Е).

Методом Вестерн-блоттинга нам удалось выявить несколько форм белка hTERP (рис. 43В,Г, 44Б,Е). Мы предполагаем, что в клетке присутствует полноразмерный белок, молекулярная масса которого составляет 13,3 кДа, и короткая форма, которая соответствует продукту трансляции зрелой формы теломеразной РНК и имеет молекулярную массу 9,9 кДа. Белок hTERP склонен к олигомеризации, которую может обеспечивать N-концевой домен белка, имеющий гомологию с доменом олигомеризации белка p62. Олигомерные комплексы были выявлены при помощи Вестерн-блоттинга препаратов рекомбинантного белка и экстрактов клеток линии HEK293T.

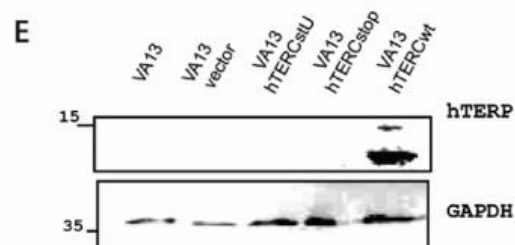
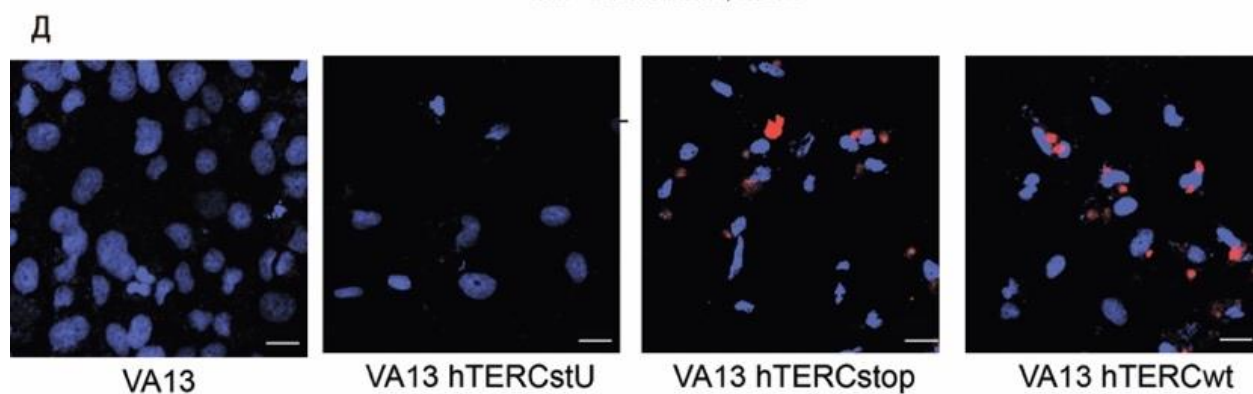
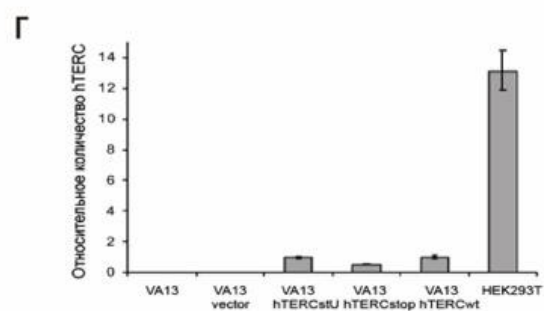
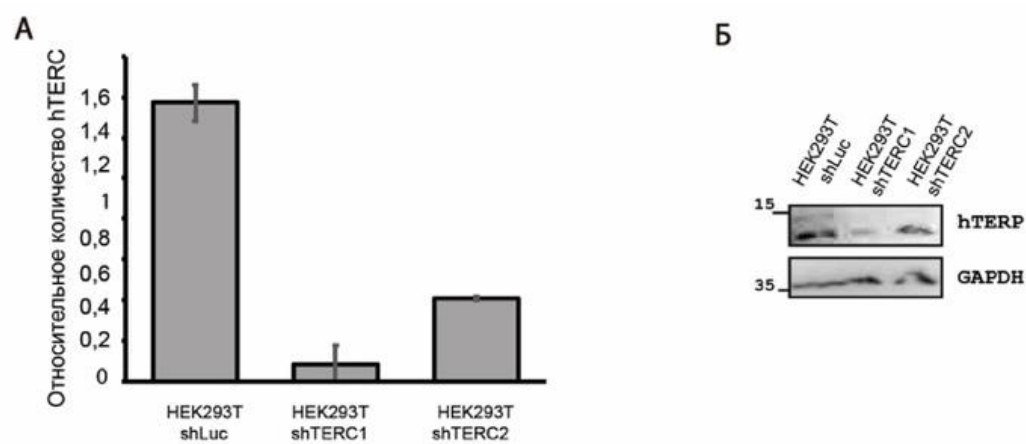


Рисунок 44. Содержание белка hTERP в клетке зависит от уровня экспрессии *hTERC*.

А. Ингибирование экспрессии *hTERC* в клетках линии HEK293Т методом РНК-интерференции, согласно данным обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени.

Б. Уменьшение количества hTERP в клетках линии HEK293Т в условиях ингибирования экспрессии *hTERC*. Верхняя панель hTERP, нижняя – GAPDH.

В. Последовательность начала открытой рамки считывания hTERP дикого типа и ее мутантных форм, используемых для экспрессии в клетках VA13.

Г. Количество теломеразной РНК человека в клетках линии VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК дикого типа и ее мутантных форм, согласно данным обратной транскрипции сопряженной с ПЦР в реальном времени.

Д. Наличие hTERP в клетках VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК дикого типа и ее мутантных форм, согласно методу иммунофлуоресцентной микроскопии. DAPI – синий, hTERP – красный.

Е. Наличие hTERP в клетках VA13 в условиях экзогенной экспрессии теломеразной РНК дикого типа и ее мутантных форм, согласно методу Вестерн-блоттинга. Верхняя панель hTERP, нижняя – GAPDH.

Окончательным и неопровержимым доказательством существования белка является его идентификация при помощи метода масс-спектрометрии. Сотрудничество с Федеральным Научно-Клиническим Центром Физико-Химической Медицины ФМБА России позволило провести LC-MS/MS-идентификацию белка hTERP в клетках HEK293Т. Предварительный анализ рекомбинантного белка hTERP показал, что в результате трипсинолиза образуются 5 пептидов, которые могут быть идентифицированы с достоверностью >99%. Метод направленного LC-MS/MS анализа позволил выявить один уникальный пептид LEAAVGPGLLR (m/z 548,3) в триптическом гидролизате белков цитоплазматического экстракта клеток HEK293Т (рис. 45А,Б). Уникальность идентифицированного пептида подтверждена при помощи поиска гомологов в полной базе данных BlastP. Концентрирование hTERP при помощи иммунопреципитации позволил

увеличить количество идентифицированных пептидов до трех (рис. 45В).

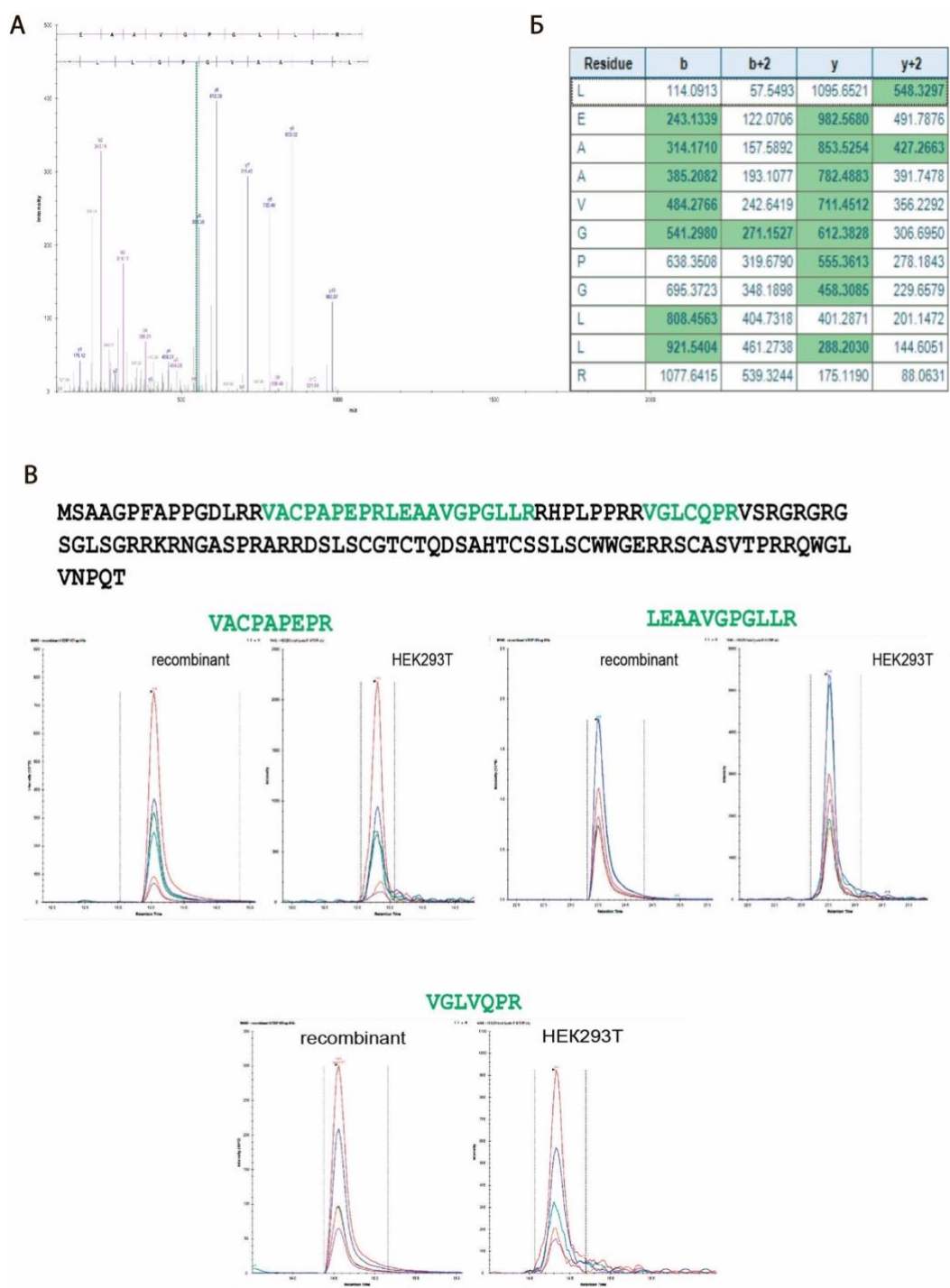


Рисунок 45. Белок hTERP идентифицирован методом масс-спектрометрии.

А. Спектр пептида, использованного для идентификации белка hTERP.

Б. Последовательность пептида и разница масс между продуктами фрагментации пептида.

В. Последовательности и спектры трех пептидов, которые были идентифицированы в клетках линии HEK293T.

Использование трех независимых подходов позволило доказать кодирующий потенциал теломеразной РНК человека и достоверно идентифицировать белок hTERP в клетках линии HEK293T, экспрессирующей *hTERC*.

Известные альтернативные функции теломеразной РНК человека позволили нам выдвинуть гипотезу об участии белка hTERP в регуляции апоптоза. Экспрессия последовательности, кодирующей теломеразную РНК человека неспособную ассоциировать с hTERT, приводит к защите CD4⁺ Т-клеток в условиях индукции апоптоза [126]. Для изучения роли белка hTERP мы воспользовались подходом loss-of-function и gain-of-function. Инактивацию синтеза белка hTERP проводили при помощи метода направленного редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9. Многочисленные попытки инактивации открытой рамки считывания не позволили получить клетки, не содержащие белка hTERP. Мы получили 10 клонов с мутациями в открытой рамке считывания, кодирующей hTERP. Оба аллеля содержали мутации только в 4 случаях. Однако, во всех случаях хотя бы один аллель имел делецию, которая не приводила к сбою рамки считывания. Мы ожидали, что в 66% случаев появления мутаций должен происходить сбой рамки считывания, т.к. делеции двух из трех нуклеотидов нарушают рамку. Анализ полученных клонов выявил, что только 16% мутаций вызывали сбой рамки считывания. Низкая эффективность сбоя рамки считывания, кодирующей hTERP, позволяет предположить, что исследуемый белок является необходимым для жизнедеятельности клеток линии HEK293T.

Мы выбрали два клона для дальнейшего исследования функциональной роли белка hTERP (рис. 46А). В клетках клона 60 произошла делеция 15 н.о. в обоих аллелях, и в этом случае N-конец hTERP укорочен на 5 аминокислот (отсутствуют аминокислоты 2-6). В клоне «71» в одном аллеле гена *hTERC* отсутствуют 7 нуклеотидов, что полностью нарушает открытую рамку считывания, а другой аллель содержит делецию 12 нуклеотидов, при которой возможен синтез hTERP с отсутствием 4 аминокислот на N-конце

(аминокислоты 2, 5-7) (рис. 46А). Мы провели анализ количества теломеразной РНК в полученных клеточных линиях и обнаружили повышение в 3 раза в клетках клона 71 и снижение в 2 раза для клеток клона 60 (рис. 46Б).

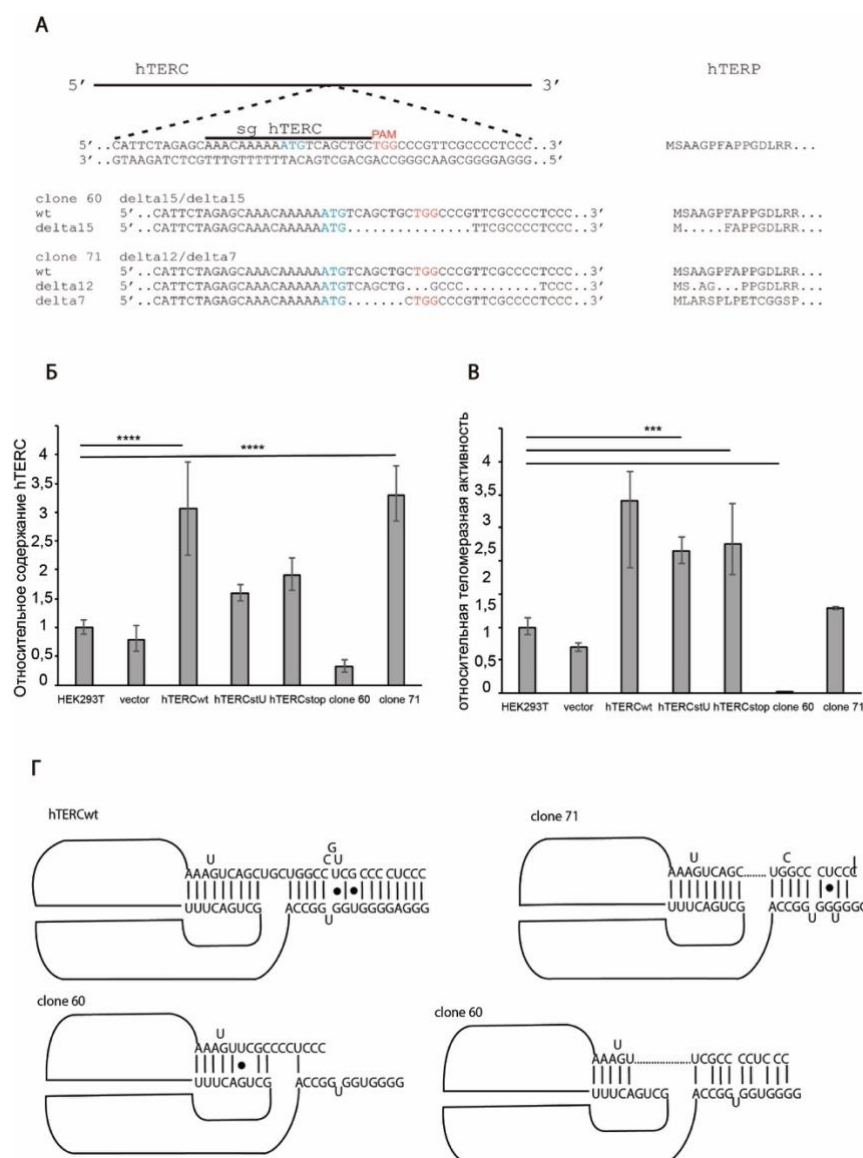


Рисунок 46. Мутантные формы теломеразной РНК человека, использованные для исследования роли hTERP.

А. Последовательность начала открытой рамки считывания hTERP дикого типа и ее мутантных форм, полученных в результате редактирования генома клеток HEK293Т.

Б. Относительное содержание теломеразной РНК человека в модифицированных клеточных линиях, использованных в исследовании роли белка hTERP.

В. Изменение теломеразной активности в модифицированных клеточных линиях.

Г. Предполагаемые изменения вторичной структуры теломеразной РНК человека в результате возникших мутаций.

Теломеразная активность не изменялась в клоне 71 и полностью пропадала в клоне 60 (рис. 46В). Такое влияние мутаций на теломеразную активность можно объяснить нарушением структуры псевдоузла hTERC, происходящего в случае делеции 15 н.о. в клоне 60 (рис. 46Г). Мутация, произошедшая в одном из аллелей клона 71, затрагивает элемент, ограничивающий матричный участок, но не нарушает структуру псевдоузла и не должен влиять на активность теломеразы (рис. 46Г). Снижение количества hTERP в обоих клонах показано при помощи Вестерн-блоттинга (рис. 47А).

При помощи трансдукции клеток НЕК293Т лентивирусными частицами мы получили набор клеточных линий с экзогенной экспрессией hTERC дикого типа и ее мутантных форм, в которых нарушена открытая рамка считывания белка hTERP. hTERC-stU мутант содержит замену в стартовом кодоне, которая инактивирует открытую рамку считывания, а в мутанте hTERC-stop произведена замена С229А, что приводит к синтезу укороченного варианта hTERP (17 а.о.) (рис. 44В). Уровень экспрессии hTERC увеличился в 1,5-3 раза, а теломеразная активность – в 2,5-3 раза во всех полученных стабильных клеточных линиях (рис. 46Б,В). Количество белка hTERP возросло только в клетках, экспрессирующих hTERC дикого типа (рис. 47А). Клетки всех полученных линий были обработаны доксорубицином или этопозидом для индукции апоптоза. Выживаемость клеток оценивали через 48 часов инкубации клеток с апоптоз-индуцирующими препаратами. Мы наблюдали значительное изменение морфологии (изменение формы клеток, потеря адгезивности, «блеbbing») всех анализируемых линий клеток, исключая НЕК293Т_hTERCwt с повышенной экспрессией hTERC дикого типа (рис. 47Б).

Морфология клеток не изменилась только в линии с повышенной экспрессией гена *hTERC* и повышенным количеством hTERP (рис. 47Б). Количественный анализ выживаемости клеток проводили с помощью колориметрического теста оценки метаболической активности клеток -МТТ. Мы наблюдали защиту клеток от апоптоза только при увеличении экспрессии

hTERC дикого типа (рис. 47В, Г). В этом случае инкубация клеток с высокими концентрациями доксорубина вызывала гибель всего лишь 20% клеток (рис. 47В). Снижение выживаемости наблюдали для клеток клона 71 (рис. 47Г).

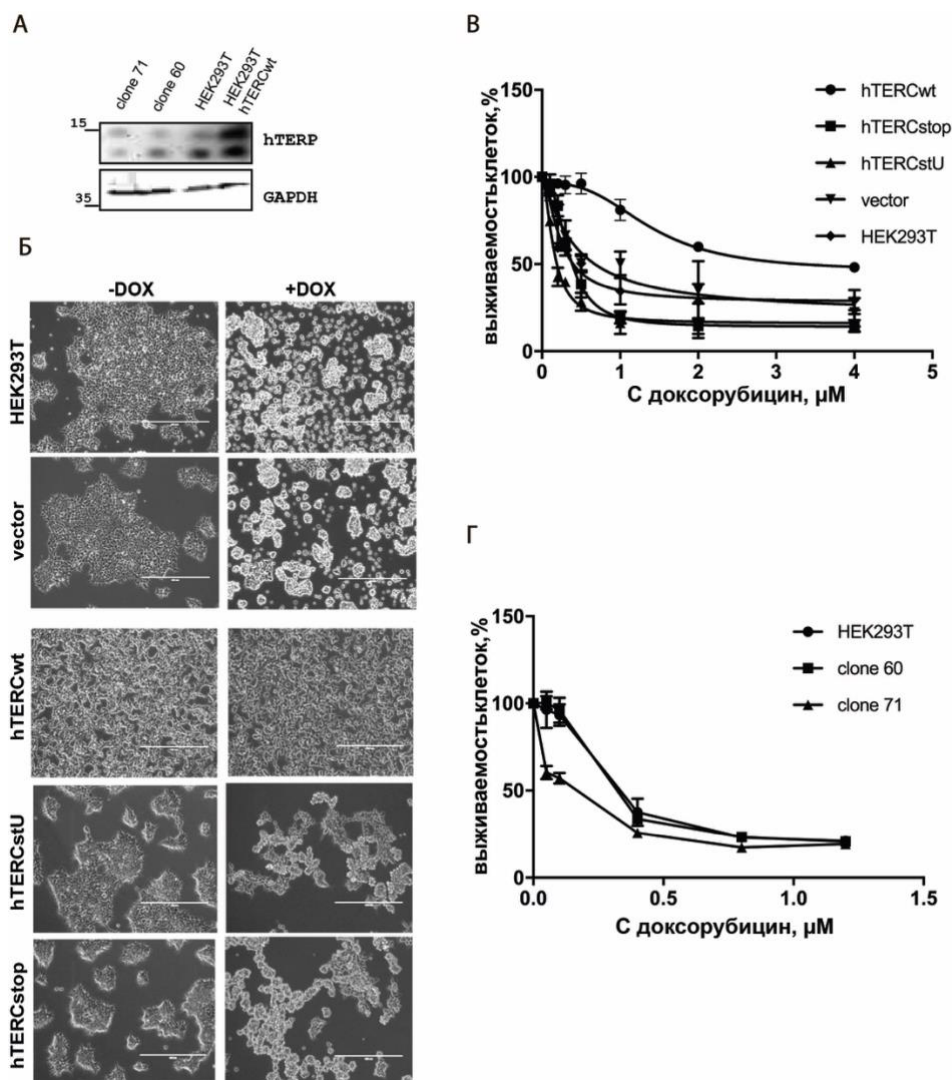


Рисунок 47. Белок hTERP защищает клетки от апоптоза.

А. Анализ содержания белка hTERP в используемых клеточных линиях методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель hTERP, нижняя – GAPDH.

Б. Изменение морфологии клеток разных линий в условиях обработки доксорубином. Микрофотографии получали через 48 часов культивации клеток в присутствии (+ DOX) или без (-DOX) доксорубина.

В. Кривые выживаемости клеток линии HEK293T с экзогенной экспрессией теломеразной РНК человека дикого типа и ее мутантных форм в условиях обработки доксорубином.

Г. Кривые выживаемости клеток клонов 60 и 71 в условиях обработки доксорубином.

Экспрессия теломеразной РНК дикого типа, но не ее мутантных форм защищает клетки от апоптоза независимо от активности теломеразы. Уменьшение количества hTERP в клетках и мутации N-концевого домена белка приводят к снижению выживаемости клеток в условиях индукции апоптоза. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что не количество теломеразной РНК и уровень теломеразной активности, а количество функционального hTERP определяет выживаемость клеток в условиях индуцированного апоптоза.

Аутофагия – процесс, поддерживающий метаболический и энергетический гомеостаз клетки. В некоторых условиях активация аутофагии противодействует гибели клеток в результате развития апоптоза. N-концевой домен (1-37 а.о) hTERP содержит домен гомологичный первым 50 аминокислотным остаткам p62/SQSTM1 (степень идентичности 30%) (рис. 48А). Данный мотив p62 способствует олигомеризации белка и его ассоциации с LCK-киназой [180]. p62 участвует в регуляции процессинга компонента аутофагосомы белка LC3. LC3 присутствует в клетках в двух формах. В нормальных условиях LC3I-форма ассоциирована с микротрубочками, а индукция аутофагии приводит к конъюгации фосфоэтаноламина и потере взаимодействия белка LC3 с микротрубочками. Образованная LC3II-форма стимулирует образование аутофагосомы, оставаясь заякоренной на мембране. Последующее слияние аутофагосомы с лизосомой приводит к деградации всех заключенных внутри компартмента компонентов, в том числе LC3II, который остается заякоренным на мембране. Существование разных форм LC3 в клетке, а также его деградация в ходе аутофагии позволяет использовать этот белок в качестве маркера активации и прогрессии этого процесса. Обработка клеток хлорокином ингибирует слияние аутофагосомы с лизосомой, что приводит к накоплению LC3 в клетке. Общее количество и соотношение форм LC3 позволяет оценивать прогресс развития аутофагии [181].

Мы оценили количество и процессинг белка LC3 в клетках HEK293T и клонах 60 и 71, полученных в результате редактирования генома, методом

Вестерн-блоттинга и обнаружили снижение общего количества LC3 в клоне 60 и повышение – в клоне 71 (рис. 48Б). Процессинг LC3 значительно снижен в обоих исследуемых клонах (рис. 48В). Методом иммунофлуоресцентной микроскопии выявлена частичная колокализация LC3 и hTERP (рис. 48Г).

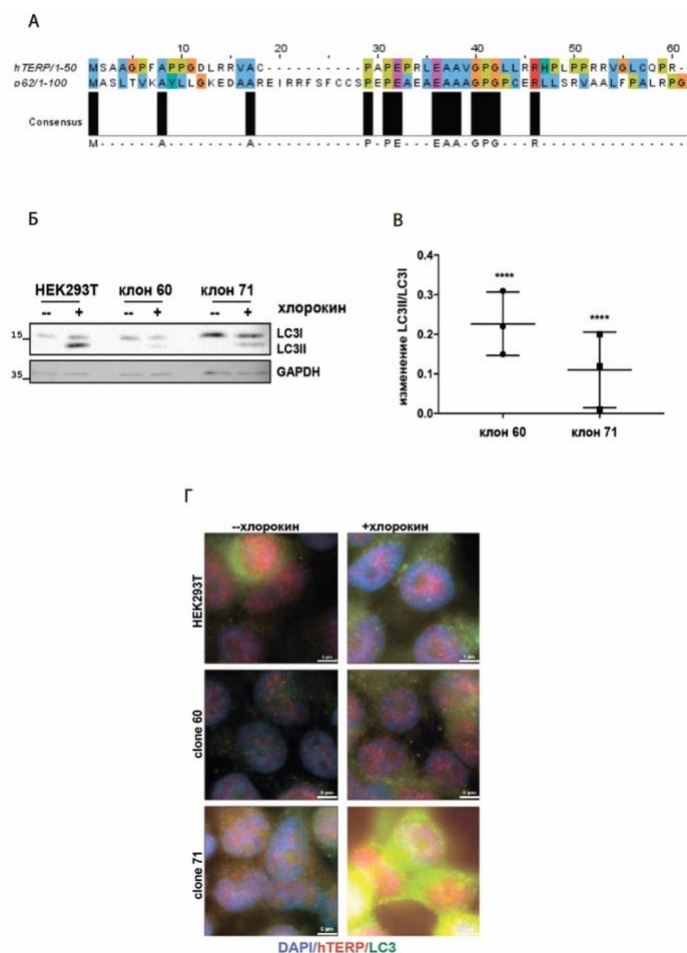


Рисунок 48. Белок hTERP участвует в регуляции аутофагии.

А. Биоинформатическое выравнивание последовательностей N-концевых доменов hTERP и p62. Визуализация выравнивания проведена в программе JalView.

Б. Анализ количества и формы белка LC3 в клетках HEK293T и клонов 60 и 71 методом Вестерн-блоттинга. Верхняя панель – LC3, нижняя – GAPDH.

В. Количественный анализ процессинга LC3 в клетках HEK293T и клонов 60 и 71. Количество LC3II нормировали на количество LC3I и эффективность процессинга в клетках HEK293T дикого типа.

Г. Иммунофлуоресцентный анализ колокализации белков hTERP и LC3 в клетках HEK293T и клонов 60 и 71 в условиях обработки хлорокином.

Исследования функционирования компонентов теломеразы в основном сосредоточены в областях, связанных с процессами опухолеобразования и механизмами, регулирующими продолжительность жизни. Незначительные усилия, направленные на изучение функций отдельных компонентов теломеразы, не связанные с функционированием фермента, выявили участие теломеразной РНК в механизмах защиты клеток в стрессовых условиях. Анализ первичной структуры гена теломеразной РНК человека, а также полученные данные о длине первичного транскрипта, его процессинге и локализации позволили предположить кодирующий потенциал классической некодирующей РНК. Мы идентифицировали белок, кодируемый теломеразной РНК человека, и убедительно продемонстрировали его участие в защите клеток от апоптоза и регуляции процесса формирования аутофагосомы [182].

3.3. Заключение

Настоящая работа была посвящена исследованию молекулярных механизмов биогенеза и функционирования компонентов теломеразы человека. Теломераза является привлекательной мишенью для разработки подходов к направленной регуляции механизмов онкотрансформации и продолжительности жизни. Активная теломераза предоставляет клеткам неограниченный потенциал деления, что реализуется большинством опухолей, а также способствует регенерации тканей. Поиск возможностей вмешиваться в регуляцию этих процессов с целью увеличения продолжительности жизни и ингибирования роста опухолей осуществляется с момента открытия фермента и его функции в организме. Теломераза состоит из нескольких компонентов и биогенез активного комплекса представляет собой мультистадийный процесс. Доскональное знание молекулярных механизмов всех этапов биогенеза и функционирования теломеразы и ее компонентов является актуальным и перспективным в аспекте поиска новых мишеней для разработки терапевтических подходов.

Основной функцией теломеразного комплекса является удлинение теломер, в процессе которого необходимо взаимодействие фермента с концом хромосом, нуклеотидный и белковый состав которого обеспечивает формирование сложных структур, защищающих ДНК от деградации и рекомбинации. Регуляция доступности теломер является одним из ключевых этапов, оказывающих влияние на способность теломеразы их удлинять.

В состав активного фермента входят два основных компонента: теломеразная РНК и обратная транскриптаза. Формирование активного комплекса и поддержание его структурной конформации является важным регуляторным этапом активности теломеразы. В большинстве соматических клеток экспрессия гена обратной транскриптазы инактивируется в процессе эмбрионального развития. Экспрессия гена теломеразной РНК человека осуществляется в большинстве соматических клеток на протяжении всей жизни организма и поддерживается на определенном уровне. Излишки синтезируемого транскрипта деградируют клеточные экзосомы. Исследования процессов опухолеобразования и выживания клеток в различных стрессовых условиях продемонстрировали, что теломеразная РНК обеспечивает защиту клеток, а также увеличивает их пролиферативный потенциал вне зависимости от активности теломеразы и длины теломер, что позволяет выдвинуть гипотезу о выполнении теломеразной РНК альтернативных функций.

В настоящем исследовании нам удалось продемонстрировать роль белка RPA в регуляции взаимодействия теломеразы с теломерами. Взаимодействие RPA с теломерами способствует расплетанию G-квартетных структур и вытеснению теломерных белков, что облегчает взаимодействие теломеразы с субстратом. Склонность к кооперативному связыванию RPA с ДНК приводит к блокировке теломерных участков, что предотвращает связывание теломеразы и ингибирует удлинение теломер.

Сборка активного теломеразного комплекса является одним из ключевых этапов регуляции активности фермента. Воздействие на отдельные

этапы этого процесса является потенциально перспективным подходом. В рамках настоящей работы выявлены структурные элементы теломеразной РНК человека, блокирование которых при помощи антисмысловых олигонуклеотидов приводит к ингибированию теломеразной активности. Фиксация определенной конформации hTERC при помощи химерных олигонуклеотидов полностью блокирует сборку фермента и ингибирует активность теломеразы.

Количество теломеразной РНК человека поддерживается в клетке на протяжении жизни организма на определенном уровне и мутации в генах, продукты экспрессии которых участвуют в процессинге hTERC, приводят к развитию различных заболеваний, характеризующихся фенотипом преждевременного старения и ассоциированных с короткими теломерами. Исследование механизма транскрипции гена теломеразной РНК человека выявил участие мультикомпонентного комплекса Интегратор в регуляции синтеза и процессинга hTERC. Интегратор в промотор-зависимой манере определяет положение терминации транскрипции, а также способствует привлечению клеточных компонентов, участвующих в процессинге или деградации теломеразной РНК человека, регулируя таким образом количество hTERC в клетке.

Исследование кодирующего потенциала теломеразной РНК человека подтвердил ее функционирование в качестве матрицы для синтеза белка. Белок hTERP, кодируемый теломеразной РНК человека, идентифицирован в клетках HEK293T при помощи масс-спектрометрических методов исследования. Мы продемонстрировали, что белок hTERP защищает клетки в условиях индукции апоптоза, а также вовлечен в регуляцию формирования аутофагосомы. Основные молекулярные компоненты сигнальных путей аутофагии и апоптоза находятся в сложных перекрестных взаимосвязях и нередко индуцируются сходными стимулами. Опухолевые клетки демонстрируют устойчивость к апоптозу, а также повышенный уровень аутофагии, что позволяет им преодолевать терапевтические воздействия.

Повышение количества теломеразной РНК, но не активацию теломеразы на начальных этапах процесса опухолеобразования связывают с усилением пролиферативной активности клеток и устойчивости клеток к стрессовым воздействиям. Можно предположить, что активация экспрессии гена теломеразной РНК человека приводит к повышению содержания hTERP в клетке, который защищает клетки в стрессовых условиях жизнедеятельности. Дальнейшие исследования функциональной роли белка hTERP позволят выяснить его участие в процессах опухолеобразования, а также жизнедеятельности клеток.

В настоящей работе исследованы различные аспекты функционирования компонентов теломеразного комплекса человека, каждый из которых является потенциальной мишенью для разработки новых подходов к воздействию на пролиферативный потенциал клетки в целях регуляции процессов опухолеобразования, а также продолжительности жизни и регенерации тканей.

ВЫВОДЫ

1. Репликативный белок А модулирует активность теломеразы *in vitro*. В условиях недостатка или избытка RPA происходит ингибирование активности теломеразы. С одной стороны, RPA облегчает взаимодействие теломеразы с теломерами. Кооперативное связывание RPA с ДНК блокирует теломерные участки, что предотвращает связывание теломеразы и ингибирует удлинение теломер при повышении количества белка.
2. Выявлены структурные элементы теломеразной РНК человека, блокирование которых при помощи антисмысловых олигонуклеотидов приводит к ингибированию теломеразной активности. Взаимодействие химерных олигонуклеотидов с двумя доменами теломеразной РНК одновременно блокирует сборку фермента и ингибирует активность теломеразы.
3. Мультисубъединичный комплекс Интегратор регулирует транскрипцию и процессинг теломеразной РНК человека. Интегратор в промотор-зависимой манере определяет положение терминации транскрипции, а также способствует привлечению клеточных компонентов, участвующих в процессинге или деградации теломеразной РНК человека, регулируя таким образом количество hTERC в клетке.
4. Субъединицы Интегратора INTS1, INTS9 и INTS11 вовлечены в регуляцию транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека. Ингибирование экспрессии генов *INTS1*, *INTS9* и *INTS11* снижает эффективность терминации транскрипции и процессинга теломеразной РНК человека. Длина первичного транскрипта hTERC в условиях ингибирования экспрессии гена *INTS1* составляет 571 н.о.
5. Теломеразная РНК человека кодирует белок hTERP. Идентифицированный белок hTERP защищает клетки в условиях индукции апоптоза, а также участвует в регуляции формирования аутофагосом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morgan T.H. Chromosomes and associative inheritance // Science. 1911. Vol. 34, № 880. P. 636–638.
2. Blackburn E.H., Gall J.G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 120, № 1. P. 33–53.
3. Bodnar A.G. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // Science. 1998. Vol. 279, № 5349. P. 349–352.
4. Watson J.D. Origin of concatemeric T7 DNA // Nature New Biol. 1972. Vol. 239, № 94. P. 197–201.
5. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol. 1973. Vol. 41, № 1. P. 181–190.
6. de Lange T. Protection of mammalian telomeres // Oncogene. 2002. Vol. 21, № 4. P. 532–540.
7. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection // Annual Review of Genetics. 2018. Vol. 52, № 1. P. 223–247.
8. Rubtsova M.P. et al. Telomere lengthening and other functions of telomerase // Acta Naturae. 2012. Vol. 4, № 2. P. 44–61.
9. Griffith J.D. et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop // Cell. 1999. Vol. 97, № 4. P. 503–514.
10. Doksani Y. et al. Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation // Cell. 2013. Vol. 155, № 2. P. 345–356.
11. Rhodes D., Lipps H.J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № 18. P. 8627–8637.
12. Biffi G. et al. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells // Nat Chem. 2013. Vol. 5, № 3. P. 182–186.
13. Oganessian L. et al. Telomerase recognizes G-quadruplex and linear DNA as distinct substrates // Biochemistry. 2007. Vol. 46, № 40. P. 11279–11290.

14. Smith J.S. et al. Rudimentary G-quadruplex-based telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. Vol. 18, № 4. P. 478–485.
15. Zaug A.J., Podell E.R., Cech T.R. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. Vol. 102, № 31. P. 10864–10869.
16. Wang F. et al. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor // Nature. 2007. Vol. 445, № 7127. P. 506–510.
17. Schramke V. et al. RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends // Nat. Genet. 2004. Vol. 36, № 1. P. 46–54.
18. Salas T.R. et al. Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34, № 17. P. 4857–4865.
19. Schoeftner S., Blasco M.A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II // Nat. Cell Biol. 2008. Vol. 10, № 2. P. 228–236.
20. Azzalin C.M. et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends // Science. 2007. Vol. 318, № 5851. P. 798–801.
21. Azzalin C.M., Lingner J. Telomere functions grounding on TERRA firma // Trends Cell Biol. 2015. Vol. 25, № 1. P. 29–36.
22. Deng Z. et al. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres // Mol. Cell. 2009. Vol. 35, № 4. P. 403–413.
23. Atalla S.L. et al. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers // Transplantation. 1985. Vol. 40, № 6. P. 584–590.
24. Avogaro L. et al. Live-cell imaging reveals the dynamics and function of single-telomere TERRA molecules in cancer cells // RNA Biol. 2018. Vol. 15, № 6. P. 787–796.
25. Cusanelli E., Romero C.A.P., Chartrand P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres // Mol. Cell. 2013. Vol. 51, № 6. P. 780–791.

26. Yamada T. et al. Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 38910.
27. Bettin N., Oss Pegorar C., Cusanelli E. The Emerging Roles of TERRA in Telomere Maintenance and Genome Stability // *Cells*. 2019. Vol. 8, № 3. P. 246.
28. Wang X. et al. Targeting of Polycomb Repressive Complex 2 to RNA by Short Repeats of Consecutive Guanines // *Mol. Cell*. 2017. Vol. 65, № 6. P. 1056-1067.e5.
29. Biffi G., Tannahill D., Balasubramanian S. An intramolecular G-quadruplex structure is required for binding of telomeric repeat-containing RNA to the telomeric protein TRF2 // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 29. P. 11974–11976.
30. Collie G.W. et al. A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex // *Nucleic Acids Res.* 2010. Vol. 38, № 16. P. 5569–5580.
31. Randall A., Griffith J.D. Structure of long telomeric RNA transcripts: the G-rich RNA forms a compact repeating structure containing G-quartets // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 21. P. 13980–13986.
32. Xu Y. et al. Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107, № 33. P. 14579–14584.
33. Balk B. et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. Vol. 20, № 10. P. 1199–1205.
34. Graf M. et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle // *Cell*. 2017. Vol. 170, № 1. P. 72-85.e14.
35. Grunseich C. et al. Senataxin Mutation Reveals How R-Loops Promote Transcription by Blocking DNA Methylation at Gene Promoters // *Mol. Cell*. 2018. Vol. 69, № 3. P. 426-437.e7.
36. Castellano-Pozo M. et al. R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation // *Mol. Cell*. 2013. Vol. 52, № 4. P. 583–590.
37. Skourti-Stathaki K., Kamieniarz-Gdula K., Proudfoot N.J. R-loops induce

- repressive chromatin marks over mammalian gene terminators // *Nature*. 2014. Vol. 516, № 7531. P. 436–439.
38. Arora R. et al. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells // *Nat Commun*. 2014. Vol. 5. P. 5220.
39. Ohle C. et al. Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair // *Cell*. 2016. Vol. 167, № 4. P. 1001-1013.e7.
40. Flynn R.L. et al. TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA // *Nature*. 2011. Vol. 471, № 7339. P. 532–536.
41. Redon S., Reichenbach P., Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase // *Nucleic Acids Res*. 2010. Vol. 38, № 17. P. 5797–5806.
42. Schoeftner S., Blasco M.A. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres // *Semin. Cell Dev. Biol*. 2010. Vol. 21, № 2. P. 186–193.
43. Chu H.-P. et al. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres // *Cell*. 2017. Vol. 170, № 1. P. 86-101.e16.
44. Mitchell J.R., Collins K. Human Telomerase Activation Requires Two Independent Interactions between Telomerase RNA and Telomerase Reverse Transcriptase // *Molecular Cell*. 2000. Vol. 6, № 2. P. 361–371.
45. Podlevsky J.D., Chen J.J.-L. Evolutionary perspectives of telomerase RNA structure and function // *RNA Biology*. 2016. Vol. 13, № 8. P. 720–732.
46. Chen J.-L. A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA // *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30, № 2. P. 592–597.
47. Huang J. et al. Structural basis for protein-RNA recognition in telomerase // *Nat Struct Mol Biol*. 2014. Vol. 21, № 6. P. 507–512.
48. Robart A.R., Collins K. Investigation of Human Telomerase Holoenzyme Assembly, Activity, and Processivity Using Disease-linked Subunit Variants // *J. Biol. Chem*. 2010. Vol. 285, № 7. P. 4375–4386.
49. Nguyen T.H.D. et al. Cryo-EM structure of substrate-bound human telomerase holoenzyme // *Nature*. 2018. Vol. 557, № 7704. P. 190–195.

50. Egan E.D., Collins K. An Enhanced H/ACA RNP Assembly Mechanism for Human Telomerase RNA // *Molecular and Cellular Biology*. 2012. Vol. 32, № 13. P. 2428–2439.
51. Kiss T., Fayet-Lebaron E., Jány B.E. Box H/ACA Small Ribonucleoproteins // *Molecular Cell*. 2010. Vol. 37, № 5. P. 597–606.
52. Cristofari G. et al. Human Telomerase RNA Accumulation in Cajal Bodies Facilitates Telomerase Recruitment to Telomeres and Telomere Elongation // *Molecular Cell*. 2007. Vol. 27, № 6. P. 882–889.
53. Zhu Y. et al. Telomerase RNA Accumulates in Cajal Bodies in Human Cancer Cells // *MBoC*. 2004. Vol. 15, № 1. P. 81–90.
54. Jány B.E., Bertrand E., Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal // *J. Cell Biol.* 2004. Vol. 164, № 5. P. 647–652.
55. MacNeil D.E., Bensoussan H.J., Autexier C. Telomerase Regulation from Beginning to the End // *Genes (Basel)*. 2016. Vol. 7, № 9.
56. Bley C.J. et al. RNA-protein binding interface in the telomerase ribonucleoprotein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108, № 51. P. 20333–20338.
57. Chen L. et al. An Activity Switch in Human Telomerase Based on RNA Conformation and Shaped by TCAB1 // *Cell*. 2018. Vol. 174, № 1. P. 218-230.e13.
58. Fu D., Collins K. Human telomerase and Cajal body ribonucleoproteins share a unique specificity of Sm protein association // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20, № 5. P. 531–536.
59. Sexton A.N., Collins K. The 5' guanosine tracts of human telomerase RNA are recognized by the G-quadruplex binding domain of the RNA helicase DHX36 and function to increase RNA accumulation // *Mol. Cell. Biol.* 2011. Vol. 31, № 4. P. 736–743.
60. Yi X. et al. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19, № 6. P. 3989–3997.

61. Vogan J.M. et al. Minimized human telomerase maintains telomeres and resolves endogenous roles of H/ACA proteins, TCAB1, and Cajal bodies // *Elife*. 2016. Vol. 5.
62. Venteicher A.S. et al. A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis // *Science*. 2009. Vol. 323, № 5914. P. 644–648.
63. Tycowski K.T. et al. A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles // *Mol. Cell*. 2009. Vol. 34, № 1. P. 47–57.
64. Schmidt J.C., Zaug A.J., Cech T.R. Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres // *Cell*. 2016. Vol. 166, № 5. P. 1188–1197.e9.
65. Hockemeyer D., Collins K. Control of telomerase action at human telomeres // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. Vol. 22, № 11. P. 848–852.
66. Chu T.W., D'Souza Y., Autexier C. The Insertion in Fingers Domain in Human Telomerase Can Mediate Enzyme Processivity and Telomerase Recruitment to Telomeres in a TPP1-Dependent Manner // *Mol. Cell. Biol.* 2016. Vol. 36, № 1. P. 210–222.
67. Greider C.W. Telomerase is processive // *Mol. Cell. Biol.* 1991. Vol. 11, № 9. P. 4572–4580.
68. Qi X. et al. RNA/DNA hybrid binding affinity determines telomerase template-translocation efficiency // *EMBO J.* 2012. Vol. 31, № 1. P. 150–161.
69. Petrova O.A. et al. Structure and function of the N-terminal domain of the yeast telomerase reverse transcriptase // *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46, № 3. P. 1525–1540.
70. Schmidt J.C., Cech T.R. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation // *Genes Dev.* 2015. Vol. 29, № 11. P. 1095–1105.
71. Podlevsky J.D. et al. The telomerase database // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № Database issue. P. D339–343.
72. Zhao J.Q. et al. Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences // *Oncogene*. 1998. Vol. 16, № 10. P. 1345–1350.

73. Zhao J. et al. Involvement of NF-Y and Sp1 binding sequences in basal transcription of the human telomerase RNA gene // FEBS Lett. 2003. Vol. 536, № 1–3. P. 111–119.
74. Zhao J. et al. MDM2 negatively regulates the human telomerase RNA gene promoter // BMC Cancer. 2005. Vol. 5. P. 6.
75. Zhao J.Q. et al. Activation of telomerase rna gene promoter activity by NF-Y, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3 // Neoplasia. 2000. Vol. 2, № 6. P. 531–539.
76. Glasspool R.M. et al. The hTERT and hTERC telomerase gene promoters are activated by the second exon of the adenoviral protein, E1A, identifying the transcriptional corepressor CtBP as a potential repressor of both genes // Neoplasia. 2005. Vol. 7, № 6. P. 614–622.
77. Bilsland A.E. et al. Transcriptional repression of telomerase RNA gene expression by c-Jun-NH2-kinase and Sp1/Sp3 // Cancer Res. 2006. Vol. 66, № 3. P. 1363–1370.
78. Levav-Cohen Y., Haupt S., Haupt Y. Mdm2 in growth signaling and cancer // Growth Factors. 2005. Vol. 23, № 3. P. 183–192.
79. Anderson C.J. et al. Hypoxic regulation of telomerase gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms // Oncogene. 2006. Vol. 25, № 1. P. 61–69.
80. Guilleret I. et al. The human telomerase RNA gene (hTERC) is regulated during carcinogenesis but is not dependent on DNA methylation // Carcinogenesis. 2002. Vol. 23, № 12. P. 2025–2030.
81. Tseng C.-K. et al. Human Telomerase RNA Processing and Quality Control // Cell Rep. 2015. Vol. 13, № 10. P. 2232–2243.
82. Goldfarb K.C., Cech T.R. 3' terminal diversity of MRP RNA and other human noncoding RNAs revealed by deep sequencing // BMC Mol. Biol. 2013. Vol. 14. P. 23.
83. Mitchell J.R., Cheng J., Collins K. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol. 19, № 1.

P. 567–576.

84. Fu D., Collins K. Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs // *Mol. Cell*. 2003. Vol. 11, № 5. P. 1361–1372.

85. Berndt H. et al. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming // *RNA*. 2012. Vol. 18, № 5. P. 958–972.

86. Rammelt C. et al. PAPD5, a noncanonical poly(A) polymerase with an unusual RNA-binding motif // *RNA*. 2011. Vol. 17, № 9. P. 1737–1746.

87. Gable D.L. et al. ZCCHC8, the nuclear exosome targeting component, is mutated in familial pulmonary fibrosis and is required for telomerase RNA maturation // *Genes Dev*. 2019.

88. Rubtsova M.P. et al. Peculiarities of Yeasts and Human Telomerase RNAs Processing // *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8, № 4. P. 14–22.

89. Tummala H. et al. Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita // *J. Clin. Invest*. 2015. Vol. 125, № 5. P. 2151–2160.

90. Moon D.H. et al. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component // *Nat. Genet*. 2015. Vol. 47, № 12. P. 1482–1488.

91. Nguyen D. et al. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA // *Cell Rep*. 2015. Vol. 13, № 10. P. 2244–2257.

92. Egan E.D., Collins K. Specificity and Stoichiometry of Subunit Interactions in the Human Telomerase Holoenzyme Assembled *In Vivo* // *Molecular and Cellular Biology*. 2010. Vol. 30, № 11. P. 2775–2786.

93. Deng T. et al. TOE1 acts as a 3' exonuclease for telomerase RNA and regulates telomere maintenance // *Nucleic Acids Res*. 2019. Vol. 47, № 1. P. 391–405.

94. Smekalova E.M. et al. Telomerase RNA biosynthesis and processing // *Biochemistry Mosc*. 2012. Vol. 77, № 10. P. 1120–1128.

95. Jamonnak N. et al. Yeast Nrd1, Nab3, and Sen1 transcriptome-wide binding maps suggest multiple roles in post-transcriptional RNA processing // *RNA*. 2011. Vol. 17, № 11. P. 2011–2025.
96. Noël J.-F. et al. Budding yeast telomerase RNA transcription termination is dictated by the Nrd1/Nab3 non-coding RNA termination pathway // *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, № 12. P. 5625–5636.
97. Jia H. et al. RNA unwinding by the Trf4/Air2/Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Vol. 109, № 19. P. 7292–7297.
98. Jia H. et al. The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex // *Cell*. 2011. Vol. 145, № 6. P. 890–901.
99. Wyers F. et al. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase // *Cell*. 2005. Vol. 121, № 5. P. 725–737.
100. Houseley J., LaCava J., Tollervey D. RNA-quality control by the exosome // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 7. P. 529–539.
101. Coy S. et al. The Sm complex is required for the processing of non-coding RNAs by the exosome // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 6. P. e65606.
102. Mouaikel J. et al. Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus // *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9, № 4. P. 891–901.
103. Gallardo F. et al. TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres // *EMBO J.* 2008. Vol. 27, № 5. P. 748–757.
104. Shukla S. et al. Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23, № 4. P. 286–292.
105. Xi L., Cech T.R. Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 13. P. 8565–8577.

106. Greider C.W., Blackburn E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts // *Cell*. 1985. Vol. 43, № 2 Pt 1. P. 405–413.
107. Yashima K. et al. Expression of the RNA component of telomerase during human development and differentiation // *Cell Growth Differ.* 1998. Vol. 9, № 9. P. 805–813.
108. Blasco M.A. et al. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis // *Nat. Genet.* 1996. Vol. 12, № 2. P. 200–204.
109. Cayuela M.L., Flores J.M., Blasco M.A. The telomerase RNA component Terc is required for the tumour-promoting effects of Tert overexpression // *EMBO Rep.* 2005. Vol. 6, № 3. P. 268–274.
110. Li S. et al. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 25. P. 23709–23717.
111. Trapp S. et al. A virus-encoded telomerase RNA promotes malignant T cell lymphomagenesis // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203, № 5. P. 1307–1317.
112. Kaufer B.B. et al. Herpesvirus Telomerase RNA(vTR)-Dependent Lymphoma Formation Does Not Require Interaction of vTR with Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) // *PLoS Pathog* / ed. Speck S.H. 2010. Vol. 6, № 8. P. e1001073.
113. Chu C. et al. Genomic Maps of Long Noncoding RNA Occupancy Reveal Principles of RNA-Chromatin Interactions // *Molecular Cell*. 2011. Vol. 44, № 4. P. 667–678.
114. Park J.-I. et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin // *Nature*. 2009. Vol. 460, № 7251. P. 66–72.
115. Liu H. et al. TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase // *Nucleic Acids Res.* 2019.
116. Alcaraz-Pérez F. et al. A non-canonical function of telomerase RNA in the regulation of developmental myelopoiesis in zebrafish // *Nat Commun.* 2014. Vol.

5, № 1. P. 3228.

117. Flynn R.L., Zou L. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress // *Trends Biochem. Sci.* 2011. Vol. 36, № 3. P. 133–140.
118. López-Contreras A.J., Fernandez-Capetillo O. The ATR barrier to replication-born DNA damage // *DNA Repair (Amst.)*. 2010. Vol. 9, № 12. P. 1249–1255.
119. Kedde M. et al. Telomerase-independent regulation of ATR by human telomerase RNA // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 52. P. 40503–40514.
120. Lees-Miller S.P., Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining // *Biochimie*. 2003. Vol. 85, № 11. P. 1161–1173.
121. Mahaney B.L., Meek K., Lees-Miller S.P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining // *Biochem. J.* 2009. Vol. 417, № 3. P. 639–650.
122. Ting N.S.Y. et al. The human telomerase RNA component, hTR, activates the DNA-dependent protein kinase to phosphorylate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 18. P. 6105–6115.
123. Morrison S.J. et al. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential // *Immunity*. 1996. Vol. 5, № 3. P. 207–216.
124. Broccoli D. et al. Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation // *Mol. Cell. Biol.* 1996. Vol. 16, № 7. P. 3765–3772.
125. Weng N.P. et al. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation // *J. Exp. Med.* 1996. Vol. 183, № 6. P. 2471–2479.
126. Gazzaniga F.S., Blackburn E.H. An antiapoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity // *Blood*. 2014. Vol. 124, № 25. P. 3675–3684.
127. Cheng Y. et al. Mitochondrial Trafficking and Processing of Telomerase RNA TERC // *Cell Reports*. 2018. Vol. 24, № 10. P. 2589–2595.
128. Eitan E. et al. Expression of functional alternative telomerase RNA component gene in mouse brain and in motor neurons cells protects from oxidative

- stress // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 48. P. 78297–78309.
129. Xu H., Nelson A.D.L., Shippen D.E. A transposable element within the Non-canonical telomerase RNA of *Arabidopsis thaliana* modulates telomerase in response to DNA damage [corrected] // *PLoS Genet*. 2015. Vol. 11, № 6. P. e1005281.
130. Cifuentes-Rojas C. et al. Two RNA subunits and POT1a are components of *Arabidopsis* telomerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108, № 1. P. 73–78.
131. Wang Y., Zhu W., Levy D.E. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR // *Methods*. 2006. Vol. 39, № 4. P. 356–362.
132. Kim N.W., Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, № 13. P. 2595–2597.
133. Cawthon R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 3. P. e21.
134. Soboleski M.R., Oaks J., Halford W.P. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells // *FASEB J.* 2005. Vol. 19, № 3. P. 440–442.
135. Baillat D. et al. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II // *Cell*. 2005. Vol. 123, № 2. P. 265–276.
136. Jodoin J.N. et al. The snRNA-processing complex, Integrator, is required for ciliogenesis and dynein recruitment to the nuclear envelope via distinct mechanisms // *Biology Open*. 2013. Vol. 2, № 12. P. 1390–1396.
137. Gardini A. et al. Integrator Regulates Transcriptional Initiation and Pause Release following Activation // *Molecular Cell*. 2014. Vol. 56, № 1. P. 128–139.
138. Weber K. et al. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis // *Mol. Ther.* 2008. Vol. 16, № 4. P. 698–706.

139. Ran F.A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature Protocols*. 2013. Vol. 8, № 11. P. 2281–2308.
140. Iftode C., Daniely Y., Borowiec J.A. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1999. Vol. 34, № 3. P. 141–180.
141. Fanning E., Klimovich V., Nager A.R. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № 15. P. 4126–4137.
142. Maga G. et al. Replication protein A as a “fidelity clamp” for DNA polymerase alpha // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 21. P. 18235–18242.
143. Lavrik O.I. et al. RPA subunit arrangement near the 3'-end of the primer is modulated by the length of the template strand and cooperative protein interactions // *Nucleic Acids Res.* 1999. Vol. 27, № 21. P. 4235–4240.
144. Kibe T. et al. Fission yeast Taz1 and RPA are synergistically required to prevent rapid telomere loss // *Mol. Biol. Cell.* 2007. Vol. 18, № 6. P. 2378–2387.
145. Neto J.L.S. et al. Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 358, № 2. P. 417–423.
146. Cohen S., Jacob E., Manor H. Effects of single-stranded DNA binding proteins on primer extension by telomerase // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. Vol. 1679, № 2. P. 129–140.
147. Skvortsov D.A. et al. Optimized detection method of telomerase activity in cancer diagnostics // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2010. Vol. 65, № 3. P. 165–169.
148. Petrenko A.A. et al. Cervical intraepithelial neoplasia: Telomerase activity and splice pattern of hTERT mRNA // *Biochimie.* 2010. Vol. 92, № 12. P. 1827–1831.
149. Rubtsova M.P. et al. Replication protein A modulates the activity of human telomerase in vitro // *Biochemistry Mosc.* 2009. Vol. 74, № 1. P. 92–96.
150. Smogorzewska A., de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. Vol. 73. P. 177–208.
151. Litman Flynn R., Chang S., Zou L. RPA and POT1: Friends or foes at

- telomeres? // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11, № 4. P. 652–657.
152. Hengesbach M. et al. Single-molecule FRET reveals the folding dynamics of the human telomerase RNA pseudoknot domain // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. Vol. 51, № 24. P. 5876–5879.
153. Antal M. et al. Analysis of the structure of human telomerase RNA in vivo // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30, № 4. P. 912–920.
154. Herbert B. et al. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96, № 25. P. 14276–14281.
155. Evfratov S.A. et al. Application of sorting and next generation sequencing to study 5'-UTR influence on translation efficiency in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 6. P. 3487–3502.
156. Terekhov S.S. et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018. Vol. 115, № 38. P. 9551–9556.
157. Terekhov S.S. et al. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017. Vol. 114, № 10. P. 2550–2555.
158. Stepanov A.V. et al. Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma // *Sci Adv.* 2018. Vol. 4, № 11. P. eaau4580.
159. Vasilkova D.V. et al. Dynamics of human telomerase RNA structure revealed by antisense oligonucleotide technique // *Biochimie.* 2013. Vol. 95, № 12. P. 2423–2428.
160. Azhibek D. et al. Chimeric bifunctional oligonucleotides as a novel tool to invade telomerase assembly // *Nucleic Acids Research.* 2014. Vol. 42, № 15. P. 9531–9542.
161. Boyraz B. et al. Posttranscriptional manipulation of TERC reverses molecular hallmarks of telomere disease // *J. Clin. Invest.* 2016. Vol. 126, № 9. P. 3377–3382.
162. Carlsten J.O.P., Zhu X., Gustafsson C.M. The multitasking Mediator complex // *Trends Biochem. Sci.* 2013. Vol. 38, № 11. P. 531–537.
163. Poss Z.C., Ebmeier C.C., Taatjes D.J. The Mediator complex and

- transcription regulation // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 48, № 6. P. 575–608.
164. Soutourina J. Transcription regulation by the Mediator complex // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017. Vol. 19, № 4. P. 262–274.
165. Skaar J.R. et al. The Integrator complex controls the termination of transcription at diverse classes of gene targets // *Cell Research*. 2015. Vol. 25, № 3. P. 288–305.
166. Rubtsova M.P. et al. Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 1701.
167. Stadlmayer B. et al. Integrator complex regulates NELF-mediated RNA polymerase II pause/release and processivity at coding genes // *Nature Communications*. 2014. Vol. 5. P. 5531.
168. Narita T. et al. NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs // *Mol. Cell*. 2007. Vol. 26, № 3. P. 349–365.
169. Cabili M.N. et al. Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution // *Genome Biology*. 2015. Vol. 16, № 1. P. 20.
170. van Heesch S. et al. Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes // *Genome Biol*. 2014. Vol. 15, № 1. P. R6.
171. Guttman M. et al. Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins // *Cell*. 2013. Vol. 154, № 1. P. 240–251.
172. Dyson H.J., Wright P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005. Vol. 6, № 3. P. 197–208.
173. Hultqvist G. et al. Emergence and evolution of an interaction between intrinsically disordered proteins // *Elife*. 2017. Vol. 6.
174. Vizcaíno J.A. et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools // *Nucleic Acids Res*. 2016. Vol. 44, № D1. P. D447–456.
175. Wilkins M.R. et al. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy

- Server // *Methods in Molecular Biology*. 2005. Vol. 112. P. 531–552.
176. Li X. et al. Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes // *Mol. Syst. Biol.* 2015. Vol. 11, № 1. P. 775.
177. Li X. et al. Defining the Protein-Protein Interaction Network of the Human Protein Tyrosine Phosphatase Family // *Mol. Cell Proteomics*. 2016. Vol. 15, № 9. P. 3030–3044.
178. Xu S. et al. Proteomic analysis of the human cyclin-dependent kinase family reveals a novel CDK5 complex involved in cell growth and migration // *Mol. Cell Proteomics*. 2014. Vol. 13, № 11. P. 2986–3000.
179. Bryan T.M. et al. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit // *Hum. Mol. Genet.* 1997. Vol. 6, № 6. P. 921–926.
180. Joung I., Strominger J.L., Shin J. Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996. Vol. 93, № 12. P. 5991–5995.
181. Kabeya Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing // *EMBO J.* 2000. Vol. 19, № 21. P. 5720–5728.
182. Rubtsova M. et al. Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways // *Nucleic Acids Research*. 2018.